

Université de Montréal

**Les lipides et les cancers urologiques
- approches épidémiologiques.
L'importance du temps immortel**

par

Vincent Fradet

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
docteur en philosophie (Ph.D.)
en sciences biomédicales
option recherche clinique

Decembre 2011

© Vincent Fradet, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
Les lipides et les cancers urologiques – approches épidémiologiques : l'importance du
temps immortel

présentée par :
Vincent Fradet, M.D.

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Francois Madore, M.D., M.Sc.
Président-rapporteur & représentant du doyen de la FESP

Jacques Leloirier, M.D., Ph.D.
Directeur de recherche

Fred Saad, M.D.
Co-directeur de recherche

Louise Roy, M.D.
Membre du jury

Jean-Pierre Grégoire, B.Pharm, M.Sc., M.P.H., Ph.D.
Examineur externe

Résumé

Objectif: Définir l'effet des lipides et du traitement de la dyslipidémie sur les cancers de la prostate et de la vessie en utilisant différents devis d'étude et en tenant compte de la présence de plusieurs biais, particulièrement le biais du temps immortel.

Devis: Le *premier volet* utilise un devis rétrospectif de type cas témoins. Un questionnaire semi-quantitatif de fréquence de consommation alimentaire validé a été utilisé. Le génotype COX2 de neuf polymorphisme nucléotidique unique (SNP) a été mesuré avec une plateforme Taqman. Des modèles de régression logistique non conditionnelle ont été utilisés pour comparer le risque de diagnostic d'un cancer de la prostate et l'interaction.

Le *deuxième volet* utilise un devis rétrospectif de type cohorte basée sur les données administratives de la Régie de l'assurance-maladie du Québec (RAMQ). Des modèles de régression de Cox ont été employés pour mesurer l'association entre les statines et l'évolution du cancer de la vessie.

Le *troisième volet*, porte un regard méthodologique sur le biais du temps immortel en examinant sa présence dans la littérature oncologique. Son importance est illustrée avec les données de la cohorte du *deuxième volet*, et les méthodes de correction possibles sont appliquées.

Résultats: L'étude du *premier volet* démontre qu'une diète riche en acides gras oméga-3 d'origine marine était fortement associée à un risque diminué de cancer de la prostate agressif ($p < 0.0001$ pour la tendance). Le ratio de cote pour le cancer de la prostate du quartile supérieur d'oméga-3 était de 0.37 (IC 95% = 0.25 à 0.54). L'effet diététique était modifié par le génotype COX-2 SNP rs4648310 ($p = 0.002$ pour l'interaction). En particulier, les hommes avec faible apport en oméga-3 et la variante rs4648310 avait un risque accru de cancer de la prostate (ratio de cote = 5.49, IC 95% = 1.80 à 16.7), effet renversé par un apport en oméga-3 plus grand.

L'étude du *deuxième volet* a observé que l'utilisation de statines est associée à une diminution du risque de progression du cancer de la vessie (risque relatif = 0.44, IC 95% =

0.20 à 0.96, $p=0.039$). Cette association était encore plus forte pour le décès de toute cause (HR = 0.57, 95% CI = 0.43 to 0.76, $p=0.0001$). L'effet des statines semble être dose-dépendant.

L'étude du *troisième volet* démontre que le biais du temps immortel est fréquent et important dans les études épidémiologiques oncologiques. Il comporte plusieurs aspects dont certains sont mieux prévenus au stade du choix du devis d'étude et différentes méthodes statistiques permettent un contrôle de ce biais.

Conclusion: 1) Une diète riche en oméga-3 aurait un effet protecteur pour le cancer de la prostate. 2) L'utilisation de statines aurait un effet protecteur sur la progression du cancer non invasif de la vessie. Les lipides semblent avoir un effet sur les cancers urologiques.

Mots-clés : cancer de la prostate, cancer de la vessie, lipides, acides gras oméga-3, statines, hypolipidémiants, étude observationnelle, données administratives, biais du temps immortel

Abstract

Purpose: To define the effects of dietary lipids and of treatment of dyslipidemia with statins on prostate and bladder cancers, using different epidemiologic study designs and accounting for biases, particularly immortal time bias.

Study Design: The *first part* used a retrospective a case-control study design. Diet was assessed with a semi-quantitative food frequency questionnaire, and nine *COX-2* tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped. We used logistic regression models to estimate odds ratios (ORs), 95% confidence intervals (CIs), and p-values for association and interaction.

The *second part* used a retrospective cohort study design based on administrative databases of Québec, Canada. Cox regression models were used to measure association between statin use and bladder cancer evolution.

The *third part* focuses on the immortal time bias by describing its presence in the oncologic literature. The importance of this bias is illustrated with data from the cohort used in the second part and statistical correction methods are applied.

Results: The *first part* showed that an increasing intake of omega-3 fatty acids of marine origin was strongly associated with a decreased risk of aggressive prostate cancer (trend $p \leq 0.0001$). The OR (95% CI) for prostate cancer comparing the highest to the lowest quartile of omega-3 intake was of 0.37 (0.25 – 0.54). The dietary effect was modified by the rs4648310 *COX-2* SNP (interaction $p=0.02$). This reflected the observation that men with low marine omega-3 intake and the variant rs4648310 SNP had an increased risk of disease (OR = 5.49; 95% CI: 1.80-16.7), which was reversed by increasing intake of marine omega-3.

The *second part* showed that statin use was associated with a decreased risk of bladder cancer progression (HR = 0.44, 95% CI = 0.20 to 0.96, $p=0.0388$). The inverse

association was even stronger for risk of mortality from all causes (HR = 0.57, 95% CI = 0.43 to 0.76, $p=0.0001$). The statin use effect appears dose-dependent.

The *third part* showed that the immortal time bias is frequent and important in many epidemiological studies in oncology. It has many aspects and some of these are better prevented at time of study design selection. Various statistical methods also allowed control of this bias.

Conclusion. 1) Dietary omega-3 appears to decrease prostate cancer risk. 2) Statin use appears to decrease risk of bladder cancer progression. Lipids seem to have an effect on urological cancers.

Keywords : prostate cancer, bladder cancer, lipids, omega-3 fatty acids, statins, hypolipidemic drugs, observationnal study, administrative database, immortal time bias

Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Cancer de la prostate	1
1.1.1. Épidémiologie du cancer de la prostate	1
1.1.2. Facteurs de risque de développement du cancer de la prostate.....	10
1.1.3. L'hypothèse causale inflammatoire	18
1.1.4. Considérations endocrinologiques moléculaires pour l'étiologie du cancer de la prostate	22
1.1.5. Prévention du cancer de la prostate.....	27
1.2. Cancer de la vessie	30
1.2.1. Épidémiologie	30
1.2.2. Facteurs de risque de développement du cancer de la vessie.....	31
1.2.3. La pathologie du cancer de la vessie	40
1.2.4. Histoire naturelle du cancer de la vessie	47
1.2.5. Le traitement du cancer superficiel de la vessie.....	49
1.3. Lipides et cancers urologiques : une hypothèse commune	56
1.3.1. Les lipides et le cancer en général.....	56
1.3.2. Les lipides et le cancer de la vessie.....	57
1.3.2. Les lipides et le cancer de la prostate.....	59
1.4. L'effet des statines sur le cancer	75
1.4.1. La découverte des statines.....	75
1.4.2. Effet préventif des statines contre le cancer.....	75
1.4.3. Effet des statines sur le cancer de la vessie.....	76
1.4.4. Mécanisme d'action des statines	77
1.5. Comparaison des types de devis d'étude épidémiologique.....	79
1.6. Les sources d'erreur en épidémiologie	81
1.6.1. L'erreur aléatoire et le rôle des statistiques.....	82
1.6.2. Les erreurs systématiques	87

1.6.3. Les biais d'information et les erreurs de classement	93
1.6.4. Le facteur de confusion.....	98
1.6.5. Contrôle de la confusion	107
2. Méthodes et Résultats : articles scientifiques.....	111
2.1. L'effet des acides gras oméga-3 de source diététique sur le risque du cancer de la prostate agressive : interaction avec la variation génétique <i>COX-2</i>	112
2.2. L'effet des statines sur l'évolution du cancer superficiel de la vessie	134
2.3. L'importance du temps immortel en épidémiologie du cancer.....	154
3. Discussion	181
3.1. Lipides et cancers urologiques – hypothèses communes?	181
3.2. Rétrospection critique des articles	184
3.2.1. Forces et faiblesses des études présentées	184
3.2.2. Regard épidémiologique sur la carcinogénèse	186
3.3. Ma programmation de recherche future	191
4. Conclusion.....	195

Liste des tableaux

Tableau 1. Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate.....	14
Table 2. Characteristics of prostate cancer cases and controls in study of aggressive disease	121
Table 3. Average intake of calories, total fat, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and fish in study population, stratified by prostate cancer status	123
Table 4. Association between dietary polyunsaturated fatty acids and aggressive prostate cancer	125
Table 5. Association between dietary fish intake and aggressive prostate cancer	126
Table 6. Association between long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and aggressive prostate cancer, stratified by COX-2 genotypes.....	127
Table 7. Characteristics of subjects in cohort evaluating bladder cancer progression....	146
Table 8. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death).....	148
Table 9. Distribution of person-time and bladder cancer recurrence events stratified by statin use – effect of correcting immortal time bias.....	170
Table 10. Distribution of person-time and bladder cancer progression events stratified by statin use – effect of correcting immortal time bias.....	171
Table 11. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-fixed statin exposure modelling approach.....	172

Table 12. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure remains constant once started	173
Table 13. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using an absolute time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure status may vary between user and non user over time	174
Table 14. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure remains constant once started, and where statin users are categorized in tertiles of cumulative statin use at end of follow-up	175
Table 15. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure is cumulative over time	176

Liste des figures

Figure 1. Hypothèse moléculaire causale du cancer de la prostate	23
Figure 2. Les erreurs systématiques ou biais	87
Figure 3. Illustration du rôle du facteur de confusion dans la relation entre exposition et issue clinique	98
Figure 4. Patient selection algorithm	142
Figure 5. Schematic representation of immortal time in a typical cohort study	160
Figure 6. Kaplan-Meier curves of bladder cancer recurrence stratified by statin use	165
Figure 7. Kaplan-Meier curves of bladder cancer progression stratified by statin use	166
Figure 8. Kaplan-Meier curves of bladder cancer recurrence stratified by tertiles of statin use	167
Figure 9. Kaplan-Meier curves of bladder cancer progression stratified by tertiles of statin use	168

*À Hélène, Aurélie, Laurent, Louis et Alice, mes amours
qui me comblent d'un constant bonheur énergisant*

*À Denyse, dont la tendresse passionnée et réconfortante
désormais évanescence depuis ton départ, nous rappelle
constamment à quel point le cancer est infiniment plus
qu'un simple sujet de recherche*

Remerciements

Jacques LeLorier et Fred Saad, qui ont su me faire cheminer tout au long de ce parcours, évidemment grâce à leur expertise scientifique, mais tout autant sur le plan humain, grâce à leur mentorat généreux poussant la rigueur et l'intégrité en science, l'organisation et la persévérance.

Mes mentors de UCSF (*University of California, San Francisco*) John Witte, Badrinath Konety et Peter Carroll, par leur mentorat, ont contribué non seulement à mon avancement sur le plan de l'oncologie urologique, mais aussi méthodologique en recherche. Mes collègues de recherche de UCSF ont aussi tous contribué à me faire réaliser différents aspects en méthodologie de la recherche : merci particulièrement à Iona Cheng et Alan Paciorek pour leurs réflexions épidémiologiques et computationnelles.

Plusieurs gens dévouées, ont contribué l'amélioration la qualité du présent texte par leur lectures et commentaires très appréciés : merci particulièrement à Gaétane Avoine, Xavier Moreel et André Caron. André s'est d'ailleurs beaucoup investi dans cette présente thèse par son rôle de consultant en programmation et structure de données. Ma compréhension de ces aspects a été amenée à un autre niveau grâce à toi! Un merci spécial à Odile Sheehy qui m'a plongé dans la programmation statistique; un défi de taille!

Le support essentiel des organismes subventionnaires a permis la réalisation de ce projet de formation. Je retiens le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S), la Fondation de l'Association des urologues du Québec, UCSF, la bourse McLaughlin du doyen de l'Université Laval, le Conseil des médecins, dentistes et pharmaciens du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ).

Mes collègues de travail, qui ont cru en la pertinence de ma recherche et ma capacité de contribuer à repousser les limites de nos connaissances, m'offrent une équipe et un environnement de travail des plus stimulants et flexibles, permettant l'éclosion de mes projets.

Yves Fradet, guide éclairant non seulement de ma jeunesse mais maintenant de ma carrière, qui réussit très bien à remplir son difficile nouveau rôle de collègue et mentor avec tact et respect de mon autonomie. Je suis vraiment fier d’avoir la chance de poursuivre la lignée de clinicien chercheur de la famille!

Je remercie de tout cœur ma grande famille qui a fait cause commune avec moi dans l’atteinte du doctorat. Avec la lourdeur des autres tâches cliniques et familiales, sans eux, ce rêve ne serait jamais devenu réalité. Je salue particulièrement le dévouement de Gaétane Avoine, grand-mère dont raffolent mes enfants, qui m’a souvent permis d’avancer mon grand projet par bourrées. Et enfin—et surtout—Hélène Marchand, partenaire de tous mes projets de vie et ma source d’énergie renouvelable. Tu as embrassé ma cause du doctorat, malgré la lourdeur de ton quotidien, avec une dévotion relevant du pur amour. Merci de ta compréhension et de ton support indéfectible. Merci beaucoup mon amour!

1. Introduction

1.1. Cancer de la prostate

1.1.1. Épidémiologie du cancer de la prostate

1.1.1.1. Tendances populationnelles

En 2009, au Canada, on estime à 171 000 le nombre de nouveaux cas de cancer et à 75 300 les décès par cancer¹. Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué de tous les cancers, et représente 25 500 nouveaux diagnostics estimés pour l'année 2009 chez l'homme. La ressemblance avec le cancer du sein est frappante, autant par la fréquence de son diagnostic—22 700 nouveaux diagnostics estimés pour l'année 2009 chez la femme et 180 nouveaux diagnostics chez l'homme—que par leur dépendance hormonale et par la complexité des mécanismes biologiques qui sous-tendent leur développement.

Le cancer de la prostate est moins agressif que d'autres types de cancer, causant annuellement la mort de 4 400 hommes canadiens, il est devancé par le cancer du poumon et le cancer colorectal. Le cancer de la prostate présente tout un spectre d'agressivité passant d'une maladie que l'on pourrait plutôt qualifier de chronique, avec une évolution très lente, à une maladie qui se développe très rapidement et qui se présente chez l'homme encore malheureusement trop souvent au Canada par des symptômes liés aux métastases.

Les différences d'incidence du cancer de la prostate en fonction du groupe ethnique ont été étudiées en Amérique du Nord, particulièrement aux États-Unis. Les Africains-américains ont le taux d'incidence du cancer de la prostate le plus élevé du monde avec une incidence relative de 1.6 par comparaison avec les hommes blancs des États-Unis d'Amérique². Qui plus est, la mortalité par cancer de la prostate ajustée pour l'âge est 2.4 fois plus élevée pour les noirs que pour les blancs. La survie globale des noirs est grossièrement plus courte de un an peu importe le type de traitements choisis pour un cancer de la prostate localisé. Cette différence persiste malgré les ajustements pour

d'autres facteurs incluant l'éducation et le niveau de revenus³. Il n'y a pas d'évidence solide indiquant le facteur déterminant dans les différences observées d'incidence ou de mortalité. Il semble probable que la source de cette disparité soit multifactorielle. En effet, plusieurs hypothèses biologiques environnementales et sociales ont été avancées pour expliquer ces différences. Toutefois, aucune hypothèse ne sort du peloton de recherche et des observations plus récentes semblent supporter que ces différences raciales sont en décroissance^{4,5}.

Quant aux autres groupes ethniques aux États-Unis, l'incidence de cancer est plus faible que celle des blancs et des noirs. Toutefois, des données comparatives pour mortalité par cancer de la prostate ne sont pas disponibles.

Dans la population mondiale prise globalement, le cancer de la prostate représente le quatrième cancer le plus fréquent. Sa survenue varie d'un facteur cent entre les pays et les populations ethniques. L'incidence la plus faible survient en Asie (1.9 cas par 100,000 en Chine), la plus élevée est rencontrée en Amérique du Nord et en Scandinavie, particulièrement pour les Africains-américains (272 cas par 100,000)⁶. De même qu'aux États-Unis, l'incidence du cancer de la prostate a augmenté dans de nombreux pays depuis le début des années 1990. Cette croissance du nombre de cas est principalement attribuée à l'introduction du dépistage par antigène prostatique spécifique sérique (PSA). Toutefois, une partie de cette augmentation est survenue avant l'utilisation de ce test⁷. La mortalité varie aussi grandement entre les pays. Elle est la plus élevée en Suède (23 par 100,000 hommes par année) et la plus faible en Asie (moins de 5 par 100,000 hommes par année à Singapour, au Japon et en Chine)⁶. Les taux de mortalité ont augmenté lentement pour la plupart des pays pendant environ 10 ans jusqu'au milieu des années 1990. Il est intéressant de noter que dans plusieurs pays où le dépistage par PSA a été introduit, le taux de mortalité semble avoir diminué^{8,9}.

Les causes sous-tendant la variation mondiale et ethnique dans l'incidence du cancer de la prostate sont multiples et complexes. Elles varient de l'accès et de la qualité des soins de santé, en incluant la pénétrance du dépistage par PSA, jusqu'à des causes plus

méthodologiques qui affectent les mesures et dépendent de la précision des registres de cancers et de la manière dont les taux de maladies sont rapportés. Par exemple, jusqu'à récemment, avant que nous ayons des données fiables sur les pays africains, il semblait que les taux de cancer de la prostate en Afrique étaient comparables à ceux en Asie. Par contre, avec la venue de données populationnelles africaines en Ouganda et au Nigéria, le cancer de la prostate semble être répandu et serait même le cancer le plus commun au Nigéria⁷.

Bien que la génétique sous-tende probablement une importante partie des variations ethniques des taux des cancers de la prostate, de plus en plus d'évidences montrent que l'environnement joue un rôle important dans la modulation du risque de contracter un cancer de la prostate. Les hommes japonais et chinois des États-Unis ont un risque de développement de cancer de la prostate et de mortalité par celui-ci plus élevé que celui de leurs familles qui sont demeurées au Japon et en Chine^{10, 11}. Dans les pays asiatiques qui développent maintenant des habitudes de vie plus occidentales, l'incidence du cancer de la prostate et la mortalité par celui-ci ont augmenté¹²⁻¹⁵.

Comme presque tous les cancers, le cancer de la prostate est associé à l'âge et son taux d'incidence atteint son zénith au début de la septième décennie de vie. Avec 85% des diagnostics atteints à l'âge de 65 ans, le cancer de la prostate est rarement diagnostiqué chez les hommes plus jeunes que 50 ans : ceux-ci représentent moins de 0.1% de tous les patients.¹⁶ Le dépistage par PSA a induit, principalement aux États-Unis où la pénétrance est très élevée, un important effet de migration d'âges : l'incidence du cancer de la prostate dans la cinquième décennie de vie a augmenté de 50% entre les années 1989 et 1992¹⁷. Les implications du processus décisionnel thérapeutique sont donc de plus en plus importantes. En effet, toutes les formes de traitement du cancer de la prostate comportent un risque d'effets secondaires, tels que la dysfonction érectile ou l'incontinence urinaire, pouvant entraver la qualité de la vie de l'homme traité. Plus celui-ci est jeune—et actif—, plus grand risque d'être l'effet sur sa qualité de vie.

En plus des variations des taux d'incidence et de mortalité par cancer de la prostate observées au cours des dernières décades, il y a eu des changements tout aussi importants

chez les hommes nouvellement diagnostiqués avec cette maladie. En effet, ceux-ci présentent maintenant des stades de la maladie beaucoup moins graves. Cette migration de stade clinique est principalement associée au dépistage du cancer de la prostate puisque les symptômes associés au cancer de la prostate localisé sont rarissimes¹⁸. Depuis l'introduction du dépistage par PSA, l'incidence de la maladie localisée ou régionale a augmenté alors que l'incidence de la maladie métastatique a diminué de manière importante⁹. Le stade de clinique T1c, représentant une maladie non palpable représente maintenant 75% des cancers nouvellement diagnostiqués¹⁹. La migration de stade clinique est également suivie d'une amélioration des taux de survie à 5 et 10 ans qui sont maintenant de 100% et 92% respectivement, pour tous les stades combinés². Des améliorations ont aussi été notées chez les patients dont le stade pathologique nécessite une prostatectomie radicale avec une augmentation de la maladie confinée à l'organe et une diminution des stades de l'extension extra-capsulaire^{19, 20}. La survie sans récurrence biochimique après prostatectomie radicale est d'ailleurs améliorée pour les patients traités tardivement dans l'ère du dépistage avec PSA.²¹

1.1.1.2. Dépistage du cancer de la prostate

Toute une controverse persiste à-propos du dépistage du cancer de la prostate. Les tendances dans les taux d'incidence clinique et pathologique, ainsi que la migration des stades précédemment décrite, montrent une évidence indirecte inférentielle que le dépistage serait bénéfique²². Par contre, les opposants au dépistage soutiennent qu'il n'y a aucune preuve qu'une détection plus précoce ait causé la diminution des taux de mortalité observés. Certains soutiennent que d'augmenter le traitement des cancers détectés grâce au dépistage cause plus de mal que de bien, les effets bénéfiques du dépistage n'étant pas encore mis en évidence par les statistiques de mortalité²³. Cette approche d'étude de la mortalité est critique puisqu'elle est la solution épidémiologique franche pour élucider l'effet du biais du temps d'avance au diagnostic (*lead time bias*). Ce biais est discuté ici, plutôt que dans la section générale portant sur les biais, compte tenu qu'il est spécifique aux études de dépistage.

Le temps d'avance au diagnostic est la période de temps entre la détection de la maladie (par un nouveau test de dépistage, typiquement) et la présentation et diagnostic cliniques usuels basés sur des symptômes ou des critères traditionnels. Le biais du temps d'avance au diagnostic survient lorsque l'effet d'un test est comparé avec une autre méthode diagnostique et qu'un test (typiquement le nouveau, expérimental) identifie la maladie plus précocement mais sans avoir un effet sur l'issue (ex : décès) de la maladie. Ce test donne alors l'impression de prolonger la survie alors qu'il ne résulte seulement en réalité qu'à un diagnostic plus précoce, comparativement aux méthodes traditionnelles. Ce biais est donc un facteur critique dont il faut tenir compte pour évaluer l'efficacité d'un test particulier, tel que le dépistage par PSA.

Le visage du dépistage du cancer de la prostate aurait pu changer récemment, mais la controverse semble vouloir persister. En effet, deux études randomisées contrôlées, publiées simultanément dans le *New England Journal of Medicine* en 2009, à propos des effets du dépistage du cancer de la prostate avec PSA sur la mortalité ont fait couler beaucoup d'encre, puisqu'elles ne répondent pas définitivement à la question.

L'étude européenne (ERSPC)²⁴ a démontré une réduction de la mortalité par cancer de la prostate (rapport de taux 0,80; IC 95%, 0,65 à 0,98) après un suivi médian de 9 ans. L'étude américaine (PLCO)²⁵ a démontré une absence de différence de la mortalité par cancer de la prostate (rapport de taux 1,13; IC 95%, 0,75 à 1,70) après un suivi médian de 7 ans.

Ces études sont empreintes de différents problèmes méthodologiques. D'abord, un problème important semble être la publication trop précoce des résultats particulièrement de l'étude américaine, qui n'avait pas rencontré de frontière statistique préalablement établie pour publier l'étude. Par contre, il est mentionné que « les membres du conseil de surveillance des données et de la sécurité de l'étude ont recommandé à l'unanimité que les données de l'étude soient publiées [...] étant donné un persistant manque de différence significative sur les taux de mortalité [...] et de l'information suggérant des effets néfastes

du dépistage ». Ces effets sont malheureusement discutés très superficiellement dans la publication.

La publication de l'étude américaine ne révèle aucune donnée statistique pour le calcul de la taille de l'échantillon. Il faut se référer à une publication précédente²⁶ pour comprendre les détails. Les calculs pour estimer la taille de l'échantillon sont résumés dans l'article européen. Les estimations apparaissent plus réalistes que les estimations américaines, particulièrement pour le taux de contamination.

Il est en fait surprenant que l'étude européenne (ERSPC) ait déjà démontré un bénéfice sur la mortalité par cancer de la prostate, une condition potentiellement grave mais qui a souvent une histoire naturelle prolongée. Les données institutionnelles de John Hopkins illustrent que, après prostatectomie radicale chez des hommes hautement sélectionnés, 82% des hommes n'auront pas de métastase 15 ans après l'intervention et le temps moyen entre la récurrence biochimique et le décès est de 13 ans²⁷. Les données de CaPSURE, un registre américain de cancer de la prostate démontrent que seulement 1 homme sur 30 (environ) diagnostiqué et traité pour cette pathologie *localisé* va mourir de sa maladie après un suivi médian d'un peu plus de 6 ans²⁸.

Il est donc très difficile de démontrer une différence, quelle que soit l'intervention choisie, à propos du cancer de la prostate localisé avec un temps de suivi inférieur à 10 ou même 15 ans. L'étude américaine est financée pour 13 ans et une publication est prévue lorsque toutes les données seront analysées. Avec un examen attentionné des courbes de mortalité par cancer de la prostate suite au dépistage, on remarque, dans les deux études, que l'incidence de mortalité est virtuellement identique jusqu'à 6 ou 7 ans, puis que les courbes se séparent graduellement par la suite. Ceci est un indice sérieux qu'avec un suivi plus long, des différences significatives pourraient se manifester.

Un exemple frappant s'est récemment produit avec deux publications dans le NEJM à propos d'un essai clinique randomisé (RCT) suédois examinant l'effet de la prostatectomie radicale versus la surveillance sur la mortalité par cancer de la prostate. La première publication, en 2002, a démontré, après un temps de suivi médian de 6.2 années,

que la prostatectomie radicale n'affectait significativement que la mortalité par cette maladie mais pas la mortalité par toute cause²⁹. Trois années plus tard, une analyse subséquente alors avec 8.2 années de suivi médian, démontrait que le bénéfice de la prostatectomie sur la mortalité par cancer de la prostate s'accroissait (risque relatif 0,56; IC 95%, 0,36 à 0,88) ainsi que le faisait la mortalité par toutes causes (risque relatif 0,74; IC 95%, 0,56 à 0,99)³⁰.

La sélection de la population étudiée par l'étude américaine, particulièrement, est biaisée par le fait d'une prévalence très élevée du dépistage du cancer de la prostate aux EU. Ainsi, cette étude a permis l'enrôlement d'une grande proportion (>40%) de sujets qui avaient eu un dépistage du cancer de la prostate dans les 3 précédentes années. Ce mode de sélection et la population étudiée mène à la principale limite de ces études qui est la contamination du groupe contrôle par le dépistage déjà présent. Ceci est particulièrement vrai aux EU. Deux hommes sur 3 n'ayant pas de diagnostic de cancer de la prostate ont déjà subi un test APS, dont 1 homme sur 2 dans les deux années précédant une importante étude américaine de sondage en 2005³¹. Dans l'étude de dépistage américaine, l'estimation du taux de contamination par le dépistage du groupe contrôle est de 52%. Ceci a été estimé par sondage d'un échantillon aléatoire de patients. Cette estimation est, selon plusieurs³², une sous-estimation importante. Plusieurs patients ont probablement subi un test de dépistage à leur insu (ou ne se rappelle pas en avoir subi un), ce qui semble d'ailleurs fréquent aux EU³³.

L'effet important de la contamination par le taux de dépistage 'de base' semble se refléter dans la faible différence entre les groupes sur l'incidence du diagnostic de cancer de la prostate (22% plus élevé dans le groupe dépistage). Aussi, presque 95% des maladies constatées dans le groupe contrôle étaient de stade I ou II, des tumeurs virtuellement toujours diagnostiquées par dépistage. Cette étude ne représente donc pas une comparaison juste entre dépistage versus absence de dépistage.

D'ailleurs, la réelle thématique de recherche posée par ces deux essais randomisés contrôlés (RCT) n'est pas « devons-nous effectuer un dépistage avec APS? » mais plutôt

« devons-nous effectuer un dépistage avec APS au delà des niveaux typiques des populations dans lesquelles ces études ont été conduites? »³⁴. Ces niveaux sont déjà plus élevés aux ÉU qu'ils ne le sont en Europe, tel que discuté plus haut. Une interprétation prudente des résultats préliminaires publiés de ces études est donc qu'il n'y aurait pas de gain en termes de mortalité (à moyen terme) par cancer de la prostate aux ÉU en intensifiant le régime de dépistage au delà du niveau actuel (déjà élevé), alors que les pays européens pourraient bénéficier d'une telle intensification.

Un autre point méthodologique qui peut être critiqué est celui de la valeur seuil à laquelle la biopsie prostatique était recommandée (APS >4.0ng/mL). Nous savons que 15% des patients avec un APS <4.0ng/mL ont un cancer de la prostate détectable par biopsie prostatique³⁵. Ce seuil est plutôt désuet comme valeur à elle seule. Les lignes directrices modernes³⁶ présentent des recommandations plus nuancées quant à l'utilisation de l'APS en dépistage. Par contre, l'étude a été conçue il y a plusieurs années, alors qu'il y avait moins d'évidence à l'encontre d'un seuil fixe relativement élevé.

Aussi, le délai entre le test de dépistage anormal et la biopsie a été prolongé dans le groupe interventionnel. Ce qui peut mener à une différence moindre sur l'issue principale (mortalité) si l'on prend en considération que le traitement du cancer de la prostate est plus efficace lorsqu'il est divulgué précocement dans l'évolution de la maladie, ce qui est d'ailleurs une des prémisses importantes d'un programme de dépistage.

Un autre point méthodologique potentiellement discutable est celui de deux exclusions dans l'analyse finale publiée de certaines données de l'étude européenne. D'une part, les auteurs ont exclu les données d'environ 17000 patients du Portugal parce qu'elles n'étaient pas disponibles. D'autre part, l'analyse finale est restreinte au groupe d'âge principal (55 à 69 ans) alors que le recrutement initial s'étendait de 50 à 74 ans. Ce groupe était prédéfini par contrat au tout début de l'étude³⁷ et correspond au groupe d'âge où le dépistage risque d'avoir le plus d'effet, d'autant plus que certaines données supportent le dépistage par APS plus précocement encore, particulièrement chez des patients avec antécédents familiaux de cancer de la prostate³⁶.

Bien que ces exclusions pourraient affecter les résultats de l'étude, il n'y a pas de direction claire dans laquelle ce biais potentiel pourrait affecter les résultats. En particulier, pour ce qui est de l'exclusion des données du Portugal, je ne m'attends pas à un impact significatif de ces données. D'abord, selon le principe de la généralisation des trouvailles, on pourrait s'attendre à un effet similaire dans toutes les populations. Ceci a été observé dans l'étude européenne : un effet plutôt similaire a été observé d'un pays à l'autre.

1.1.1.2.1. Y aurait-il eu d'autres options de devis d'étude?

Cette question est très difficile à répondre compte tenu du contexte dans lequel ces études ont été faites, qui a des limitations financières, temporelles (dont séculaires) et autres. Mais aussi parce que les auteurs comprennent des cliniciens et épidémiologistes parmi les meilleurs au monde ! Toutefois, j'aborde cette question avec une approche idéale, où tout pourrait être refait.

Idéalement, cette étude aurait dû être faite dans les années 1980, alors que le dépistage par APS n'était encore pas utilisé à grande échelle comme il l'est maintenant, aux EU particulièrement. Ceci aurait minimisé les problèmes de contamination par le dépistage du groupe contrôle. De plus, ici les cancers les plus agressifs (normalement plus facilement détectables) ont déjà, en bonne partie, été éliminés de la population à l'étude par devis. Une forte proportion de patients (environ 50%) qui ont déjà eu un test de dépistage ont été inclus dans l'étude.

Un autre moyen de mesurer, avec plus de validité, la contamination par le taux de dépistage de base dans le groupe contrôle aurait été que les chercheurs contactent le médecin traitant d'une proportion de patients et lui demandent s'il avait prescrit un test de dépistage avant et/ou pendant l'étude. Ceci aurait permis d'expliquer l'absence de différence observée dans l'étude américaine.

De la même manière, en sélectionnant une autre population, les conclusions pourraient être différentes. Ainsi, une étude similaire à celles faites pourrait être menée (et peut encore l'être), mais avec une cohorte où le dépistage du cancer de la prostate par PSA

n'est pas couramment utilisé. En théorie, il faudrait alors être en mesure de divulguer la qualité de soins moderne, telle qu'appliquée dans ces deux études, pour laquelle une baisse séculaire de la mortalité par cancer de la prostate est aussi attribuée.

1.1.2. Facteurs de risque de développement du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est une maladie complexe en de nombreux sens. Un trait ou une maladie appelée complexe réfère à un phénotype qui ne présente pas un patron de transmission génétique classique mendélienne attribuable à un gène unique; ce phénotype présente toutefois une tendance familiale. On peut aussi nommer la composante héréditaire du cancer de la prostate comme étant multifactorielle en ce qu'elle est causée à la fois par des facteurs environnementaux et génétiques. Une évidence considérable suggère maintenant qu'à la fois des facteurs génétiques et environnementaux jouent un rôle dans le développement et l'évolution du cancer de la prostate. L'épidémiologie classique et moléculaire ont permis d'identifier plusieurs facteurs de risque de l'initiation et du développement de cette maladie.

1.1.2.1. Les influences génétiques et familiales

Les premières évidences décrivant le regroupement familial du cancer de la prostate ont été publiées à partir des années 1960 et suggéraient que le risque de développement du cancer de la prostate était plus élevé chez les individus avec un parent au premier degré affecté.³⁸

La méthodologie de l'épidémiologie génétique s'est complexifiée au fil des dernières décades mais dérive directement de l'épidémiologie classique. Initialement, les études d'agrégation familiale ont permis de démontrer une augmentation du risque de cancer de la prostate chez les enfants ou les générations subséquentes^{39, 40}. L'agrégation familiale d'une maladie est mesurée par le risque relatif de récurrence ou le ratio de risque familial^{40, 41}. L'autre devis d'études traditionnelles permettant de distinguer les éléments non génétiques partagés dans les familles des éléments génétiques transmis sont les études de jumeaux et d'adoption. Ces études, lorsqu'appliquées à des traits complexes, comme le

cancer de la prostate, divisent la variance phénotypique dans des composantes héréditaires ou génétiques versus les composantes environnementales partagées par les pères de jumeaux et dans les composantes environnementales non partagées entre les jumeaux. Ces études ont permis des avancées majeures dans la définition de la composante génétique de plusieurs maladies dont les cancers⁴¹.

Une fois la base de génétique des maladies établie, le mode de transmission des maladies peut être étudié avec les analyses de ségrégation dans les familles. Aussi, il est important de cartographier les gènes spécifiques contribuant à ce trait génétique. Les analyses de ségrégation révèlent l'apport des facteurs et leur mode d'hérédité dans les formes familiales. Elles concluent à la survenue d'une forme familiale de cancer de la prostate (au moins deux cas chez des apparentés du premier degré) dans 13 à 26% des cas et à un risque relatif pour un parent du premier degré (père, fils ou frère du sujet atteint) de 1.6 à 11. Ce risque varie avec le nombre d'apparentés atteints, le degré de parenté et l'âge au diagnostic de l'apparenté porteur du cancer³⁸.

Nous distinguons maintenant, principalement pour des fins de recherche, le cancer de la prostate en trois phénotypes : sporadique, familial et héréditaire. Le cancer de la prostate sporadique survient chez des individus avec une histoire familiale négative. Le cancer de la prostate familial est défini chez un homme qui a un ou plus apparentés affectés. Le cancer de la prostate héréditaire est un sous-ensemble du cancer familial et a été défini avec des critères stricts : trois cas chez des apparentés du premier degré ou du second degré, ou deux cas diagnostiqués avant l'âge de 55 ans⁴². Cette définition ne représente que 5% des patients affectés par le cancer de la prostate.

Deux autre devis d'études visent à identifier les gènes responsables impliqués dans les maladies : les études de co-ségrégation (*linkage*) et les études d'association. Les études de co-ségrégation visent à identifier la localisation chromosomique des gènes associés au phénotype d'intérêt. Les études de co-ségrégation étudient la transmission des loci dans les familles et permettent une cartographie relativement grossière étant donné qu'elles ont une résolution génétique limitée. Ces études sont basées sur l'hypothèse que plus les gènes sont

près, plus ils seront transmis génétiquement en bloc ou, inversement, moins ils seront recombinaison. Ces études visent donc à définir la fraction de recombinaison des différents gènes. Quant à elles, les études d'association sont basées sur des fréquences populationnelles contrastant avec la transmission génétique concordante des études de co-ségrégation. Les études d'association n'assument pas de mode de transmission génétique particulier, contrairement aux études de co-ségrégation. Ce type d'études aurait aussi un avantage dans le cas de maladies complexes, telles que le cancer de la prostate, où plusieurs gènes d'intensité modérée sont impliqués plutôt que des gènes plus rares de très haute pénétrance. La modélisation mathématique sous-tendant les analyses d'épidémiologie génétique devient de plus en plus complexe et représente une surspécialité en soi. La dernière évolution des études d'épidémiologie génétique représente les études d'association pan-génomique (*genome wide association study*). Elles ont permis de nombreuses percées d'identification des gènes associés à la susceptibilité au cancer de la prostate, mais aussi de localisation chromosomique où des gènes ne sont pas encore identifiés.

Les localisations chromosomiques des gènes de susceptibilité au cancer de la prostate est décrite dans le Tableau 1. Le gène le mieux caractérisé est le gène HPC1. Il a été identifié en 1996⁴³ puis confirmé à répétition^{44, 45}. Le gène HPC1 est rare et présente une transmission autosomale dominante avec une haute pénétrance; c'est-à-dire que même s'il n'est pas la cause de plusieurs cancers de la prostate, les porteurs de ce gène sont très à risque d'être affectés par cette maladie. Les cancers de la prostate associés au gène HPC1 ont un grade plus élevé et ont des stades plus avancés mais présentent toutefois une histologie similaire au cancer de la prostate sporadique⁴⁶⁻⁴⁸.

L'étude de ce gène est particulièrement intéressante. En effet, en 2002, le gène sous-jacent à cette région chromosomique a été encodé et défini comme étant l'enzyme RNASEL qui est une enzyme antivirale et pro-apoptotique⁴⁹. L'enzyme RNASEL joue un rôle important dans la médiation biologique des interférons, particulièrement en réponse aux infections virales. Elle permet la dégradation de l'ARN et prévient la réplication virale en interférant avec la synthèse protéique, ce qui conduit à l'apoptose⁵⁰. Un polymorphisme

nucléotidique unique (SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*) le R462Q a été identifié comme étant un facteur de risque du cancer de la prostate⁵¹. En effet, cette mutation inactive l'enzyme RNASEL. Ce domaine de recherche est sujet à une intense activité puisqu'il pourrait expliquer un lien important entre la génétique et l'environnement, plus particulièrement les infections virales en tant que cause du cancer de la prostate.

Tableau 1. Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate

Maladie ou association morbide	Gène (locus)	Fonction
Cancers héréditaires de la prostate	<i>ELAC2/HPC2</i> (17p11)	Inconnue
	<i>RNase L/HPC1</i> (1q24-25)	Apoptose et sensibilité à l'infection
	<i>SR-A/MSR1</i> (8p22-23)	Inflammation et sensibilité à l'infection
	<i>OGG1</i> (3p26.2)	Réparation de l'ADN suite à des dommages oxydatifs
	<i>CHEK2</i> (22q12.1)	Signalement des dommages à l'ADN et contrôle du cycle cellulaire
	<i>PON1</i> (7q21.3)	Antioxydant
	<i>MIC1</i> (19p13)	Inflammation
Cancers héréditaires de la prostate et du sein	<i>BRCA2</i> (13q12.3)	Réparation de l'ADN
Cancers héréditaires de la prostate et du cerveau	<i>CAPB</i>	Inconnue

Adapté de Cussenot O. et Cancel-Tassin G. Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate, *MS : médecine/sciences*, vol. 20, n° 5, 2004, p. 562-8

1.1.2.2. Les habitudes de vie comme facteurs de risque du cancer de la prostate

1.1.2.2.1. L'activité sexuelle

Telle que discutée dans la section sur le rôle de l'inflammation intra-prostatique comme hypothèse causale du cancer de la prostate, une théorie bien développée est que l'activité sexuelle expose la prostate à des agents infectieux. Ceci pourrait entraîner une augmentation du risque de cancer, d'une manière similaire à la relation causale entre le papilloma virus humain et le cancer du col chez la femme. Quelques études ont trouvé une association entre l'exposition sexuelle précoce, le nombre de partenaires sexuels et le risque de cancer de la prostate⁵², quoique d'une manière non consistante⁵³⁻⁵⁵. Qui plus est, deux études ont même rapporté un effet protecteur sur le cancer de la prostate de l'éjaculation fréquente avec des risques relatifs variant de 0.66 à 0.89^{54, 56}. Dans l'étude de Giles, l'effet protecteur était observé chez les hommes qui rapportaient avoir plus de cinq éjaculations par semaine durant la troisième décennie de leur vie; l'étude de Leitzmann a observé un effet protecteur chez les hommes rapportant plus de vingt éjaculations par mois durant la troisième à la cinquième décennie de leur vie, ceci durant l'année précédant l'étude et comme moyenne à vie. Les mécanismes biologiques sous-tendant cet effet sont inconnus.

1.1.2.2.2. La vasectomie

Une relation entre la vasectomie et le risque de cancer de la prostate a initialement été médiatisée en 1993 par deux larges études de Harvard, une rétrospective⁵⁷, l'autre de prospective⁵⁸. L'augmentation du risque était de 60% et croissait avec le temps, c'est-à-dire que plus les hommes avaient subi leur vasectomie tôt, plus le risque de développer un cancer de la prostate était élevé. Deux récentes méta-analyses rapportaient des augmentations de 23 à 37% du risque de cancer suite à cette intervention^{59, 60}. Il y avait une tendance linéaire suggérant une augmentation du risque de 10% par chaque décennie depuis la vasectomie. Les mécanismes biologiques sous-tendant cette association demeurent

inconnus, quoique une activation du système auto-immunitaire par la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes, une diminution de la concentration des androgènes dans le sperme ou encore des activités sécrétoires ont été proposés. Toutefois, tel que discuté dans la section 1.6.3.2. portant sur le biais de détection, ce biais, conséquemment à un suivi différentiel entre les patients ayant subi une vasectomie versus ceux qui n'en n'ont pas subi, pourrait peut-être expliquer la petite ampleur de l'effet observé. En effet, plus l'ampleur d'une association est faible, plus une association épidémiologique fallacieuse risque d'être observée. D'ailleurs, une récente étude cas témoins bien conduite, portant une attention particulière à la longue période de latence théorique entre la vasectomie et le diagnostic de cancer, était négative.⁶¹ La controverse persiste donc quant à cet effet.

1.1.2.2.3. Tabagisme

La fumée de cigarette pourrait représenter un facteur de risque pour le cancer de la prostate puisqu'elle est une source d'exposition au cadmium, qu'elle augmente les niveaux circulants d'androgène et qu'elle cause un stress oxydatif cellulaire important. Toutefois, plusieurs études ont produit des résultats opposés et aucune n'a démontré une association de type dose réponse claire. Cependant, une étude a suggéré une association avec un stade de diagnostic plus avancé et une augmentation de la mortalité par cancer de la prostate⁶². À noter qu'une confusion par l'attitude envers la santé en général pourrait être reliée à l'adoption de mesures de dépistage du cancer de la prostate et donc potentiellement confondre cette association observée.

1.1.2.2.4. L'obésité

L'obésité a été suggéré comme étant un facteur de risque du cancer de la prostate, étant donné la survenue commune chez les hommes d'âge moyen et les clairs liens entre l'obésité et les cancers du côlon et du sein^{63, 64}. En effet, la graisse blanche chez les mammifères possède non seulement un rôle de réservoir énergétique mais est aussi un organe endocrine sécrétant d'importantes quantités de cytokines⁶⁵. Plusieurs études ont associé l'IMC et la circonférence de la taille en association positive avec des marqueurs de

stress oxydatifs^{66, 67}. De plus, le traitement de l'obésité par une réduction de la consommation grasseuse et par une augmentation de l'exercice a mené à une réduction du stress oxydatif, suggérant que les modifications des habitudes de vie pourraient être importantes pour réduire le risque de cancer en général et peut-être particulièrement celui de la prostate⁶⁸.

En contrepartie, les études de cohortes qui ont examiné la relation entre les mesures anthropométriques et le risque de cancer de la prostate ont mené à des résultats discordants^{69, 70}, quoique deux études ont même suggéré un effet protecteur d'un IMC plus élevé chez les hommes de 60 ans et moins^{71, 72}. De manière importante, il existe une relation inverse entre les taux d'androgènes circulants et les mesures d'obésité⁷³. Ceci pourrait expliquer pourquoi un IMC plus élevé est associé à une plus faible concentration sérique de l'antigène prostatique spécifique⁷⁴. Une telle observation pourrait mener à un biais de détection concernant la possibilité de subir une biopsie prostatique et pourrait expliquer les effets protecteurs de l'obésité sur le risque du cancer de la prostate. En contrepartie, une étude a suggéré que l'obésité sévère ($\text{IMC} \geq 35$) était associée à des tumeurs de plus haut grade et un taux de récurrence biochimique après prostatectomie radicale plus élevé dans une cohorte d'hommes avec trouvailles pathologiques favorables⁷⁵.

1.1.2.2.5. La consommation d'alcool

La consommation d'alcool est d'intérêt pour le risque de cancer de la prostate compte tenu de son association avec d'autres types de cancer, de son effet sur les hormones sexuelles et du haut contenu en composés polyphénoliques possédant une activité antioxydante importante, particulièrement dans le vin rouge. Une revue de la littérature épidémiologique portant sur le sujet a observé un risque de cancer de la prostate stable parmi les buveurs d'intensité légère à modérée⁷⁶. Une cohorte prospective subséquente à cette revue a observé une augmentation du risque de cancer de la prostate qui était dose dépendante. En effet, ce type de cancer était plus élevé chez les sujets qui consommaient plus de trois consommations d'alcool fort par jour (risque relatif de 1.85) sur une période de onze ans⁷⁷. Enfin, une autre étude avait démontré que la consommation d'alcool totale

n'était pas associée au cancer de la prostate, mais que la consommation de un à trois verres de vin rouge par semaine avait un effet protecteur (risque relatif 0.82). Ceci était observable même après avoir ajusté pour l'âge, le dépistage par APS, le nombre total de partenaires sexuels ainsi que pour le tabagisme⁷⁸.

1.1.3. L'hypothèse causale inflammatoire

1.1.3.1. L'hypothèse globale

L'hypothèse à propos des mécanismes sous-tendant la causalité du cancer de la prostate, qui est certainement la plus étudiée de par le monde, est sans contredit celle de l'inflammation chronique. L'inflammation chronique peut mener à l'hyper-prolifération cellulaire afin de réparer les tissus endommagés. Cette inflammation peut mener au développement de cancers classiquement associés aux infections tels que les cancers du côlon, de l'œsophage, de l'estomac, de la vessie et du foie^{79, 80}. Des études actuelles supportent un processus similaire dans le développement du cancer de la prostate. Ces évidences sont de nature épidémiologique, histologique, génétique et interactive entre ces différentes variables. L'histoire scientifique qui se déroule au cours de la présente décade, qui est celle du gène HPC1, de l'enzyme RNASEL et de l'infection virale en est un bel exemple.

L'hypothèse étiologique infectieuse du cancer de la prostate trouve de plus en plus d'appui dans la littérature. Deux méta-analyses ont rapporté des associations statistiquement significatives entre le cancer de la prostate et l'antécédent d'infections transmises sexuellement (risque relatif 1.4) ou de prostatite (ratio de cote 1.57)^{59, 81}. Des associations positives entre le taux d'anticorps contre la syphilis, le virus du papillome humain et l'herpès virus 8 humain et le cancer de la prostate supportent cette hypothèse⁸⁰. Un taux plasmatique élevé de cytokines pro-inflammatoires semble conférer un risque de cancer de la prostate accru. Des pathogènes viraux ont été isolés et mis en évidence dans les tissus prostatiques humains qui incluent des polyomavirus et des virus de papillome humain ainsi que des cytomégalo virus^{82, 83}.

D'autres sources d'inflammation intra-prostatique telles que des lithiases ou du reflux d'urine intra-prostatique ont aussi été proposées. Ces infiltrats inflammatoires peuvent mener à des lésions appelées de l'atrophie inflammatoire proliférative (*Proliferative Inflammatory Atrophy, PIA*) et sont fréquemment retrouvées dans les spécimens prostatiques⁸⁴. Le processus inflammatoire intrinsèque à ces lésions a été bien décrit et se retrouve limité à ces zones anormales et non pas dans l'épithélium sain⁸⁵. L'hypothèse est que ces lésions de PIA puissent se transformer en néoplasie intra-épithéliale prostatique. Cette trouvaille pathologique surtout lorsqu'elle est de haut grade représente l'équivalent d'un carcinome *in situ* de la prostate. Celle-ci est considérée comme un stade pré-malin du développement du cancer de la prostate.

Les mécanismes de défense cellulaire contre le processus inflammatoire incluent les enzymes antioxydantes qui transforment l'oxygène réactif et les espèces nitrogéniques (ce qui mène à la prévention des mutations du génome), les enzymes de réparation de l'ADN muté et l'habilité de suivre le chemin de l'apoptose si le dommage à l'ADN est trop sévère. Une analyse des gènes de susceptibilité connus pour le cancer de la prostate suggère que les mutations acquises ou transmises dans les gènes responsables des mécanismes de défense cellulaire contre l'infection et le stress oxydatif permettraient au cancer de la prostate de se développer. Un modèle intégré peut être proposé liant l'inflammation chronique et les défauts dans les capacités cellulaires de réparation aux différents niveaux mentionnés. Les concepts le supportant sont les suivants⁸⁶ :

- a) Les défauts de deux gènes de susceptibilité (HPC1/RNASEL et SR-A /MSR1) prédisposent les souris aux infections;
- b) Les infections à inflammation chronique font la promotion de la synthèse de neuf gènes réactifs et des espèces nitrogéniques induisant un stress oxydatif;
- c) L'évidence histologique de la présence et de la réponse inflammatoire quantifiée en terme d'infiltrant et de foyers d'atrophie inflammatoire proliférative est importante;

- d) Les défauts dans les enzymes antioxydantes PON1 et GSTP1 facilitent le dommage oxydatif de l'ADN;
- e) Les défauts dans les gènes SR-A/MSR1 et MIC1 permettent une réponse inflammatoire sans restriction;
- f) Les défauts dans le gène RNASEL permettent aux cellules d'échapper aux mécanismes normaux du processus d'apoptose ce qui résulte en l'établissement de l'expansion clonale des cellules malignes.

Cette hypothèse donne un banc de travail pour les études expérimentales futures mais aussi donne la rationnelle théorique pour utiliser les agents antioxydants ou anti-inflammatoires comme agents de chimioprévention du cancer.

1.1.3.2. Précisions à propos de la cascade inflammatoire

Les sources potentielles d'inflammation intra-prostatique incluent la diète⁸⁷, les infections bactériennes^{59, 88}, les infections virales^{89, 90} et les reflux d'urine intra-prostatiques^{91, 92}.

L'inflammation chronique pourrait jouer un rôle sur le développement et la progression tumorale par différents mécanismes :

- a) La mutagenèse causée par le stress oxydatif généré par la réponse immune aux pathogènes et aux autres agressions;
- b) Le recrutement de cellules immunitaires;
- c) L'induction de cytokines et de facteurs de croissance pouvant contribuer à stimuler un environnement prolifératif et angiogénique.

De nombreux gènes et facteurs de transcription qui jouent un rôle dans l'immunité innée et dans l'inflammation ont été associés au cancer de la prostate. Ces gènes incluent les récepteurs de reconnaissance des patrons extracellulaires (PRR) MSR1⁹³⁻⁹⁹ et les toll-like (*TLR*). Les TLR sont une classe de protéines qui jouent un rôle clé dans l'immunité innée puisqu'ils reconnaissent les molécules antigéniques dérivées des microbes et activent

les réponses cellulaires immunitaires. Les TLR4^{100, 101}, le locus TLR1, 6, 10¹⁰², et TLR5¹⁰³; le gène antiviral RNASEL^{51, 98, 104-107}; les gènes contrôlant la production des cytokines macrophages inhibitory cytokine-1 (MIC1)⁹⁷, IL8¹⁰⁸, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)^{109, 110} et l'antagoniste du récepteur IL1 (symbole du gène IL1RN) aussi appelé IL1 inhibiteur IRAP (*IL1 Receptor Antagonist Protein*) : IL1 inhibitory activity^{103, 111}.

Le gène pro-inflammatoire *COX2* a aussi été associé à la carcinogenèse prostatique^{112, 113}. L'équipe du Dr Witte, le laboratoire où j'ai travaillé à San Francisco, a récemment montré que la variation génétique de *COX2* était associée au risque de cancer agressif de la prostate¹¹⁴. Les études de biomarqueurs supportent aussi l'association d'un statut pro-inflammatoire avec le développement du cancer de la prostate : des taux circulants plasmatiques élevés de marqueurs pro-inflammatoires comme les cytokines IL1-beta et TNF-alpha – ainsi que des marqueurs anti-inflammatoires – ont été associés au risque de cancer de la prostate dans des études de devis cas seulement et de cas contrôle¹¹⁵⁻¹¹⁷. Enfin, les facteurs de transcription jouent un rôle important dans le contrôle de l'appareillage cellulaire. NF-kappa-B est un facteur de transcription pléiotropique, actif dans le noyau, lorsque exprimé dans de très nombreux types cellulaires. Il est stimulé et activé par une variété très grande de stimuli inflammatoires. Les travaux de l'équipe du laboratoire du Dr Fred Saad, dont ceux que j'ai pilotés¹¹⁸, ont démontré que NF-kappa-B était un prédicteur de la récurrence de cancer post-prostatectomie de stade pT3. Ces études ainsi que les travaux dirigés par les autres membres de l'équipe caractérisant les mécanismes de contrôle de la signalisation cellulaire impliquant NF-Kappa-B¹¹⁹⁻¹²¹ ont contribué à l'établissement de la cascade NF-Kappa-B comme un des liens reconnus et grandement étudié reliant l'inflammation au cancer¹²².

Si les dérèglements cellulaires entraînant des situations pro-inflammatoires semblent importants, bloquer la réaction inflammatoire semble aussi avoir un effet protecteur sur le cancer. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont lié la consommation d'aspirine et d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à une réduction du risque de cancer de la prostate^{123, 124}. Les AINS inhibent les enzymes *COX* et

réduisent donc les produits pro-inflammatoires qui en résultent, mais pourraient aussi avoir d'autres mécanismes d'action. L'équipe du laboratoire du Dr Witte a récemment observé que l'effet protecteur des AINS sur le cancer de la prostate était modifié par la variation génétique de l'info toxine alpha (LTA)¹²⁵.

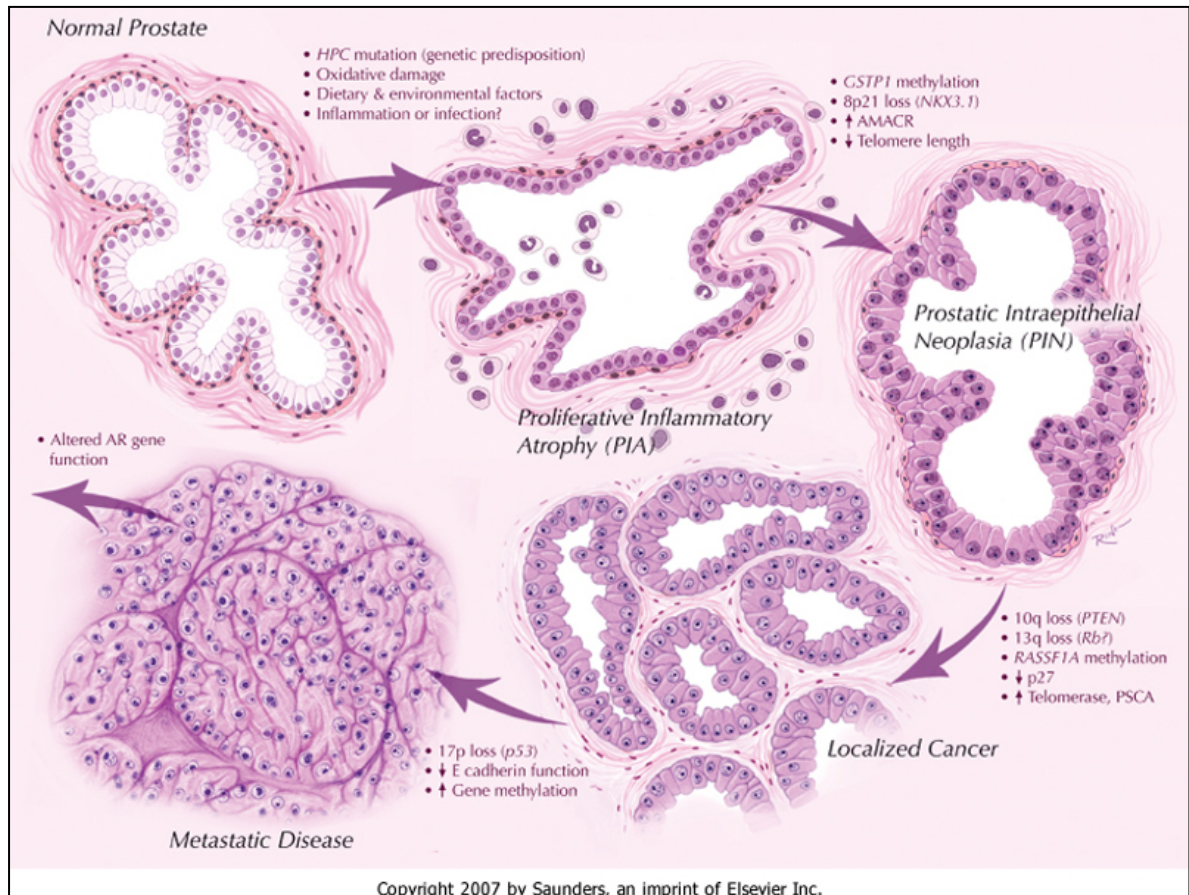
1.1.4. Considérations endocrinologiques moléculaires pour l'étiologie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est unique parmi les tumeurs solides dans le fait qu'elles existent en deux formes : une forme histologique ou latente, qui peut être identifiée chez environ 30% des hommes de 50 ans et plus et 60 à 70% des hommes de 80 ans et plus; et une forme cliniquement évidente, qui affecte environ un homme sur six en Amérique du Nord. Évidemment, l'intensité avec laquelle on recherche cette forme cliniquement évidente par des méthodes telles que le dépistage discuté dans les sections précédentes, va affecter grandement notre capacité de mettre en évidence cette forme cliniquement significative. Ceci est dû au fait que la très grande majorité des hommes affectés par leur cancer de la prostate localisé n'ont aucun symptôme.

Il est généralement accepté que la forme latente du cancer de la prostate a une prévalence similaire de par le monde et parmi toutes les ethnies, alors que l'incidence du cancer de la prostate clinique varie de manière importante entre les pays et à l'intérieur même de ceux-ci. Pour cette raison, une compréhension de l'étiologie du cancer de la prostate doit s'attarder aussi aux étapes qui mènent à la fois à l'initiation du cancer histologique latent et à la progression vers la maladie cliniquement évidente. La relation moléculaire précise liant les formes latentes et cliniques du cancer de la prostate n'est pas connue mais il est fort probable que la progression de la forme latente à la forme cliniquement évidente ait un continuum biologique avec un chevauchement des événements moléculaires causaux. La Figure 1 illustre bien l'hypothèse étiologique du cancer de la prostate la plus populaire qui est basée sur une synthèse des données de biologie moléculaire disponibles. Elle illustre comment les mutations génétiques, la répression de la

transcription des gènes par méthylation des zones de promotion, ainsi que d'autres mécanismes dont des modifications protéiques sont impliqués dans la carcinogenèse du cancer de la prostate.

Figure 1. Hypothèse moléculaire causale du cancer de la prostate



Avec permission, tiré de Klein E.A., Platz E.A. et Thompson I.J., Epidemiology, Etiology and Prevention of Prostate Cancer, chapitre 90, Campbell-Walsh Urology, neuvième édition, éditeur Wein A.J., Elsevier, 2006

1.1.4.1. L'influence des androgènes

Les androgènes influencent le développement, la maturation et le maintien de la prostate, en affectant à la fois la prolifération et la différenciation de l'épithélium de la lumière glandulaire. Il y a peu de doute que l'exposition variable mais surtout à vie de la prostate aux androgènes joue un rôle important dans la carcinogenèse prostatique. Une hypothèse en vogue est que l'incidence élevée de cancers de la prostate observée chez les Afro-américains puisse être liée au taux élevé d'androgènes circulants. Des études ont démontré que les jeunes Afro-américains avaient un niveau circulant de testostérone totale 15% plus élevé que celui des Caucasiens ainsi que des niveaux plus élevés des métabolites androgéniques qui reflètent le niveau d'activité de l'enzyme 5-alpha-réductase transformant la testostérone en dihydrotestostérone. Ces niveaux étaient plus élevés que ceux des hommes japonais¹²⁶⁻¹²⁸. L'absence d'exposition de la prostate aux androgènes à long terme semble protéger contre le développement du cancer. Toutefois, une relation dose réponse entre les niveaux d'androgènes et le risque de cancer n'a pas été établie. En particulier, à l'intérieur de l'éventail des concentrations normales et physiologiques d'androgènes, le risque de cancer de la prostate ne semble pas varier¹²⁹⁻¹³². En effet, une méta-analyse des études prospectives n'a pas trouvé de différence entre les concentrations sériques d'androgènes¹³³, alors qu'une étude prospective avant l'ère du dépistage par PSA, a observé que les hommes avec un niveau plasmatique de testostérone totale et libre plus élevé avaient un risque plus faible de cancer de prostate de haut grade¹³².

Les androgènes semblent avoir un rôle critique dans la carcinogenèse prostatique. L'androgène primaire de la prostate est la dihydrotestostérone, qui est catalysée de manière irréversible à partir de la testostérone par la 5-alpha-réductase. La dihydrotestostérone se lie au récepteur androgénique intra-cytoplasmique avec une affinité beaucoup plus grande que le fait la testostérone, la liaison de la testostérone au récepteur androgénique augmente la translocation du complexe stéroïde-récepteur vers le noyau et donc l'activation des éléments de la réponse androgénique¹³⁴. Il existe deux iso-enzymes de la 5-alpha-

réductase, qui sont le produit de deux gènes séparés. La 5-alpha-réductase de type 1 est exprimée principalement dans la peau et le foie et à une intensité moindre dans la prostate; l'enzyme de type 2 est exprimée prédominamment dans l'épithélium prostatique et dans d'autres tissus génitaux¹³⁵.

Une enzyme 5-alpha-réductase de type 2 fonctionnelle est un pré-requis pour le développement normal de la prostate et des organes génitaux externes mâles, une exposition moindre de la prostate à la dihydrotestostérone semble protéger contre le développement du cancer de la prostate. Les hommes ayant une déficience congénitale de la 5-alpha-réductase ont un tissu prostatique minuscule, les biopsies démontrent une absence d'épithélium et seulement une présence de stroma¹³⁶. En plus du manque d'activité enzymatique, un manque de testostérone semble aussi protéger contre le développement du cancer de la prostate, tel que mis en évidence par les prostates atrophiques observées chez les hommes après castration chirurgicale¹³⁷.

D'autres niveaux d'évidence impliquant la dihydrotestostérone dans la carcinogenèse prostatique proviennent d'études populationnelles, qui ont démontré une association entre l'hyperplasie bénigne prostatique et le cancer de la prostate avec les niveaux de testostérone et de dihydrotestostérone sanguins. En effet, les niveaux de testostérone bio-disponibles circulants sont les plus élevés chez les Américains d'origine asiatique, intermédiaires chez les Américains d'origine africaine et les plus bas chez les Caucasiens¹³⁸. Qui plus est, le ratio dihydrotestostérone: testostérone était le plus élevé chez les Afro-américains, intermédiaire chez les Caucasiens et le plus faible chez les Asiatiques-américains. Cette distribution du ratio dihydrotestostérone : testostérone ressemble étrangement à la fois à l'incidence et à la mortalité par cancer de la prostate dans ces différents groupes ethniques.

Le récepteur androgénique sert de médium pour l'activité de la testostérone et de la dihydrotestostérone en initiant la transcription des gènes répondant aux androgènes. Une mutation génétique du gène du récepteur androgénique mesurée par une longueur plus courte de la répétition des trinuécléotides CAG de l'exon 1 du gène a été associée à maintes

reprises avec un risque augmenté de cancer de la prostate, ainsi qu'avec une maladie hormono-réfractaire^{139, 140}. Cette mutation semble affecter la fonction du gène : des études *in vitro* suggèrent qu'un long segment répété CAG est associé à une trans-activation plus faible de la testostérone une fois liée aux récepteurs androgéniques¹⁴¹. Ceci amènerait une réponse cellulaire plus atténuée en réponse aux androgènes.

Les polymorphismes de l'enzyme 5-alpha-réductase encodée dans le gène appelé SRD5A2 ont des conséquences fonctionnelles *in vitro* et chez les humains¹⁴². Une substitution de l'alanine par la thréonine au codon 49 confère une activité enzymatique plus grande par un facteur 5 et a été associée à un pronostic sombre, particulièrement chez les Hispaniques et les Afro-américains^{143, 144}. Une autre étude plus récente a démontré qu'une autre forme de polymorphisme génétique du gène SRD5A2 était importante. Le polymorphisme nucléotidique unique (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) fréquent V89L a été bien caractérisé fonctionnellement et entraîne une activité enzymatique réduite de la 5-alpha-réductase de type 2. Cette étude cas témoin conduite chez des hommes caucasiens français a démontré que les porteurs homozygotes du génotype LL avaient un risque augmenté des cancers de la prostate cliniquement significatifs (ratio de cote de 1.89, intervalle de confiance à 95% [IC 95%] de 1.07 à 2.74). Ce génotype était aussi associé aux formes les plus agressives de cancers (ratio de cote de 2.56, IC 95% de 1.41 à 4.63)¹⁴⁵.

Les gènes encodant les enzymes impliquées dans la synthèse de la testostérone ont présenté des résultats discordants quant à leur association avec le risque de cancer de la prostate¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Par contre, il semble que les gènes impliqués dans la dégradation de la testostérone et de la dihydrotestostérone démontrent des associations plus claires avec le risque de cancer de la prostate. Par exemple, le gène HSD3B2 qui code pour la 3-béta-hydroxystéroïde déshydrogénase, une enzyme qui contribue à l'inactivation de la dihydrotestostérone, est importante pour réguler les niveaux d'androgènes intra-prostatiques. Des études cas témoins du polymorphisme génétique HSD3B2 ont identifié que des répétitions génétiques complexes étaient associées à des différences significatives de risque de cancer de la prostate^{149, 150}. Une autre enzyme impliquée dans la dégradation

de la testostérone est nommée CYP3A4. Un polymorphisme de CYP3A4 a été associé aux cancers de la prostate localement avancés et pauvrement différenciés, tumeurs que l'on rencontre plus fréquemment chez les Africains-américains¹⁵¹⁻¹⁵³.

1.1.5. Prévention du cancer de la prostate

“Prevention is so much better than healing because it saves the labor of being sick.”

Thomas Adams, 1918

L'hypothèse en vogue de la carcinogenèse prostatique est une séquence d'étape moléculaire induite par des changements génétiques et épigénétiques qui dérèglent des cascades contrôlant la balance entre la prolifération et la mort cellulaire. La présence de lésions précurseurs qui représentent les stades intermédiaires entre des cellules normales et malignes, jusqu'à au moins vingt ans avant l'apparition du cancer, et la notion que l'incidence du cancer de la prostate et de tous les cancers dépend de l'âge, suggèrent que la carcinogenèse survient lentement sur un long intervalle de latence. En théorie, ceci donne l'opportunité d'intervenir avant que la néoplasie maligne soit établie avec des interventions diététiques, des changements des habitudes de vie (diète, tabagisme, exercice), ou par chimio-prévention. Ceci est défini comme l'utilisation des produits naturels ou synthétiques ayant pour objectif de renverser, d'inhiber ou de prévenir le développement du cancer. L'objectif primaire de la chimio-prévention est de diminuer l'incidence d'un cancer en particulier et en même temps de réduire les effets secondaires reliés au traitement, ainsi que ultimement la mortalité. L'agent utilisé pour la chimio-prévention doit être efficace, non toxique et ciblé sur les cascades moléculaires impliquées dans la carcinogenèse.

Le cancer de la prostate de par son incidence élevée, sa prévalence encore plus élevée et par une mortalité non négligeable, est un cancer attrayant pour la prévention primaire.

1.1.5.1. Les inhibiteurs de la 5-alpha-reductase

Le champ de la prévention du cancer de la prostate a vécu un changement révolutionnaire par deux études publiées dans les derniers sept ans à propos d'effets de médicaments inhibiteurs de la 5-alpha-réductase sur l'incidence du cancer de la prostate. La première étude, la *Prostate Cancer Prevention Trial* (PCPT), a démontré une réduction de 25% de la survenue de cancers de la prostate sur une période de sept ans d'interventions avec la finastéride versus un placebo¹⁵⁴. La prévalence de tumeurs de grade élevé (7 à 10) était plus grande dans le groupe finastéride que dans le groupe placebo (6.4% versus 5.1%). Les effets sexuels étaient plus communs avec la finastéride alors que les symptômes urinaires étaient plus communs avec le placebo. La deuxième étude similaire, l'étude *Reduce* a démontré sur une période d'étude de quatre ans, que la dutastéride réduit le risque d'incidence de cancer de la prostate détecté à la biopsie de 23%. Il y avait plus de tumeurs de grade élevé dans le groupe dutastéride. Il y avait moins de symptômes urinaires dans le groupe dutastéride. Il y avait davantage de dysfonction érectile avec la dutastéride¹⁵⁵.

Ces grandes études randomisées contrôlées ont démontré des résultats très similaires et ont établi l'efficacité des inhibiteurs de la 5-alpha-réductase pour prévenir le cancer de la prostate. À noter qu'il persiste une controverse quant à la possible augmentation des cancers de haut grade pour lequel une série d'explications existe et l'explique probablement. L'autre point de débat est au sujet de la pertinence clinique des cancers de la prostate qui sont réellement prévenus, soit ceux de bas grade (Gleason inférieur à 7 sur 10). Ces cancers sont ceux qui menacent le moins la vie du patient car la majeure partie est de forme indolente. Toutefois, d'un point de vue santé publique, cette approche de chimio-prévention est attrayante parce que le nombre de traitements curatifs serait diminué de près du quart, soit la réduction du nombre de cancers diagnostiqués par l'utilisation de la médication. En effet, une majeure partie des hommes diagnostiqués avec un cancer de la prostate de bas grade reçoit un traitement curatif malgré une absence de menace pour la vie, et une minorité est placée sous un protocole de surveillance.

1.1.5.2. Les autres agents de prévention

Le sélénium et la vitamine E ont été étudiés dans l'étude *SELECT*. Il s'agissait d'une étude de phase III randomisée contrôlée à l'aveugle avec un devis d'étude basé sur la population, conçue pour tester l'efficacité du sélénium et de la vitamine E seul ou en combinaison pour prévenir le cancer de la prostate. Les résultats de cette étude ont été publiés d'une manière prématurée en 2009 puisque les substances seules ou en combinaison n'ont pas prévenu la survenue du cancer de la prostate¹⁵⁶. Ces trouvailles ont révolutionné le monde de la prévention et ont engendré tout un débat. En effet, les essais randomisés contrôlés sont particulièrement limités à l'intervention qu'ils testent. Dans ce cas-ci, la dose et les préparations pharmacologiques utilisées ont fait l'objet de tout un débat.

La même année, étaient publiés des résultats de l'étude randomisée contrôlée de la *Physicians' Health Study II*.¹⁵⁷ Celle-ci évaluait l'effet de la vitamine C et E dans un devis factoriel pour prévenir le cancer de la prostate et l'ensemble des cancers chez les hommes. Cette étude fut aussi négative.

Ces résultats étaient surprenants compte tenu du niveau de preuves des études précédentes. Ces deux études ont non seulement remis en question les doses et les préparations pharmacologiques des interventions qui ont été étudiées mais aussi ont établi que la prévention du cancer ne pourrait pas se faire de la même façon chez tout le monde. En effet, les susceptibilités génétiques interindividuelles à certaines substances varient grandement. Le niveau basal des substances potentiellement bénéfiques étudiées peut aussi varier. Par exemple, les taux sériques d'alpha-tocophérol (vitamine E) peuvent varier beaucoup alors que la fenêtre bénéfique thérapeutique est assez étroite. On imagine facilement que la même dose de vitamine E puisse ne pas atteindre la fenêtre thérapeutique potentielle chez plusieurs individus alors qu'elle peut amener d'autres individus dans la zone toxique.

Enfin, une multitude d'études épidémiologiques suggèrent que certaines substances puissent exercer un effet préventif sur le cancer. La diète pourrait jouer un rôle avec le poisson et les acides gras oméga-3 d'origine marine¹⁵⁸, les tomates et les lycopènes¹⁵⁹, le

soya et les isoflavones¹⁶⁰ ainsi que le thé vert et les catéchines¹⁶¹ pourraient toutes entraîner une réduction du risque du cancer de la prostate. Aussi, des médicaments pourraient jouer ce rôle : les anti-inflammatoires non stéroïdiens¹⁶², en particulier, les inhibiteurs *COX2* spécifiques¹⁶³. Les modulateurs sélectifs du récepteur de l'estrogène, comme le torémifène, semblent avoir un effet dans les modèles animaux.^{13, 164}

1.2. Cancer de la vessie

1.2.1. Épidémiologie

Le cancer de la vessie est le 5^e organe solide le plus fréquemment atteint du cancer avec 6 900 nouveaux diagnostics estimés pour l'année 2009, dont la majorité—presque 3 sur 4—survient chez l'homme¹.

1.2.1.1. Coûts reliés au traitement du cancer de la vessie

Les coûts reliés au traitement du cancer de la vessie sont très importants. Le cancer de la vessie est le cinquième cancer le plus coûteux aux Etats-Unis représentant 3.7 milliards de dollars US (valeur 2001), après le cancer du sein, colon et rectum, poumon et prostate. Toutefois, le cancer de la vessie a un coût par patient traité le plus élevé de tous les cancers. Ceci s'explique par la longue survie des patients diagnostiqués avec un cancer superficiel de la vessie, ce qui représente d'ailleurs plus des deux tiers des nouveaux diagnostics ; et le suivi intense et coûteux avec cystoscopie, parfois traitements intravésicaux adjuvants, ou répétition de la chirurgie transurétrale ; un risque élevé d'environ 50% de récurrence et un risque de 5 à 10% de progression oncologique nécessitant cystectomie radicale et/ou traitements systémiques avec chimiothérapie. Les coûts s'élèvent à 96 553 \$ US par patient traité, à partir du diagnostic jusqu'au décès, basé sur les paiements Medicare totaux^{165, 166}.

1.2.2. Facteurs de risque de développement du cancer de la vessie

1.2.2.1 Facteurs de risque occupationnels : amines aromatiques

La plupart des carcinogènes affectant l'urothélium et particulièrement la vessie, sont des amines aromatiques. Les travailleurs de différents types d'industrie peuvent y être exposés et avoir un risque de cancer de la vessie accru. Ce concept est connu depuis la fin du XIX^e siècle. Les colorants à base d'amiline introduits tardivement dans le XIX^e siècle sont des carcinogènes urothéliaux¹⁶⁷. D'autres agents chimiques ont été reconnus comme carcinogènes pour la vessie incluent : le 2-naphthylamine, le 4-aminobiphenyl, le 4-nitrobiphenyl, le 4-4-diaminobiphenyl (benzidine) et le 2-amino-1-naphthol¹⁶⁸ ; les gaz de combustion et la suie provenant du charbon, possiblement les hydrocarbures aliphatiques chlorinés¹⁶⁹ ; et certains aldéhydes comme l'acroléine utilisée dans les colorants chimiques et dans l'industrie du textile et du caoutchouc¹⁷⁰. Il a été estimé que l'exposition occupationnelle cause environ 20% des cancers de la vessie aux États-Unis¹⁷¹. Des périodes de latence prolongées jusqu'à trois ou cinq décades sont typiques. Ceci représente probablement le fait que la dose cumulative de ces carcinogènes peut être importante et que, en contrepartie, avec une exposition plus intensive, cette période de latence pourrait bien être raccourcie¹⁷². Si la plupart des industries chimiques et de manufactures se déplacent de l'Amérique du Nord vers les autres régions du monde, on s'attendrait à observer une réduction des cas de cancers de la vessie; toutefois ceci n'a pas (encore?) été observé. Il est impossible de déterminer si ceci implique que d'autres carcinogènes environnementaux ou industriels ont remplacé ceux qui ne se retrouvent plus en Amérique du Nord, ou si l'effet a une très longue période de latence.

D'autres sources potentielles d'amines aromatiques sont les nitrites et les nitrates provenant de la l'alimentation qui sont transformés par la flore bactérienne intestinale¹⁷³ et des contaminants retrouvés dans une "herbe chinoise" dont l'indication est théoriquement pour la perte de poids et qui était très fréquemment consommée dans les années 1980 et 1990 en Belgique. Cette herbe s'appelait *Aristolochia fangchi* et son métabolite est l'acide aristolochique, molécule néphrotoxique et carcinogénique. L'acide aristolochique est un

composé faisant partie de la classe des amines aromatiques. Cette classe de substance est considérée à haut risque de carcinogénicité puisqu'elle modifie l'ADN (*DNA adducts*)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

En somme, les professions qui ont été associées au risque augmenté de cancer de la vessie incluent les travailleurs de l'industrie automobile, les peintres, les conducteurs de camion, les travailleurs du cuir, du métal et les machinistes; ainsi que d'autres corps de métier exposés à des agents chimiques organiques comme le nettoyage à sec, la manufacture de papier, la fabrication de cordes et de ficelles, les techniciens dentaires, le barbier ou l'esthéticien, le médecin et les plombiers^{177, 178}.

1.2.2.2. Le tabagisme

Les fumeurs de cigarette ont une incidence de cancer de la vessie quatre fois supérieure aux individus qui n'ont jamais fumé^{179, 180}. Toutes les formes d'association de dose-réponse sont importantes : le risque corrèle en effet avec le nombre de cigarettes fumées, la durée du tabagisme et le degré d'inhalation de la fumée. Arrêter de fumer réduit l'incidence de cancers de la vessie comparativement à ceux qui fument activement¹⁸¹. Par contre, la réduction du risque jusqu'au retour du niveau de base ajusté pour l'âge, prend une vingtaine d'années après l'arrêt du tabagisme, une période beaucoup plus longue que celle nécessaire à la réduction du risque cardio-vasculaire et du cancer du poumon une fois que le tabagisme est arrêté. Les autres formes de tabagisme sont associées seulement avec une petite augmentation du risque de cancers de la vessie¹⁸⁰. Il a été estimé qu'un tiers des cas de cancers de la vessie était relié au tabagisme par cigarette¹⁸² ; mais cette association est clairement compliquée par le tabagisme ancien qui représente aussi un risque et que la majorité des personnes âgées de 60 ans et plus (qui représente encore presque les trois-quarts des patients qui développent un cancer de la vessie) ont un antécédent de tabagisme. Enfin, le risque lié à la fumée secondaire semble important puisque les épouses de fumeurs de longue date en Israël ont aussi un risque de cancer de la vessie plus élevé¹⁸³. En contrepartie, il est incertain que la fumée secondaire d'origine occupationnelle (par exemple, les barmans) est associée au cancer de la vessie.

Le carcinogène chimique spécifiquement responsable pour le cancer de la vessie dans la fumée de cigarette n'a pas encore été identifié hors de tout doute. On retrouve par exemple des nitrosamines, du 2-naphthylamine et du 4-aminobiphenyl. Par ailleurs, les métabolites du triptophane sont augmentés dans l'urine des fumeurs. Toutefois, l'intérêt pour le 4-aminobiphenyl est plus marqué que pour les autres substances puisque ce composé se retrouve dans de nombreux agents chimiques industriels ainsi que dans la fumée de cigarette. Aussi intéressant est le fait que la cascade de détoxification de cet agent commence par un processus d'acétylation. Une enzyme importante dans le processus d'acétylation est l'enzyme N-acétyl-transférase 2 (NAT2). Un polymorphisme génétique significatif est retrouvé dans la population caucasienne et une variation génétique est associée à une augmentation de l'activité de cette enzyme. Il a d'ailleurs été démontré que les patients atteints de cancer de la vessie comparativement aux patients non atteints de cancer de la vessie ont des génotypes associés au métabolisme d'acétylation lent¹⁸⁴. Ceci était indépendant du statut d'exposition au tabagisme ou aux carcinogènes industriels. Il s'agit d'un autre bel exemple que le génotype d'un individu, qui peut affecter la fonction de différentes enzymes de métabolisme et de détoxification, peut être un important confondant dans de nombreuses analyses épidémiologiques. Toutefois, cette mesure n'est pas fréquemment mesurée. Pour des raisons évidentes de coûts et d'accès aux tissus.

La consommation de café et de thé avait été impliquée dans quelques études étiologiques du cancer de la vessie, mais une fois que le tabagisme par cigarette était pris en ligne de compte, la consommation de café n'était plus associée au cancer de la vessie¹⁸⁵ tout comme c'est le cas pour de nombreux autres cancers d'ailleurs.

1.2.2.3. L'abus d'analgésiques

La consommation d'énormes quantités (environ 10 kilogrammes sur une période de 10 ans) d'agents analgésiques contenant de la phénacétine est associée à une augmentation du risque de carcinome urothélial du bassinet rénal ainsi que de la vessie¹⁸⁶. La phénacétine a une structure chimique similaire à celle des colorants anyline et donc des amines aromatiques. La période de latence est longue et implique au moins deux décades.

Tout ceci suggère des mécanismes causaux similaires aux amines aromatiques et aux expositions industrielles ainsi qu'au tabagisme. Toutefois, l'association avec d'autres analgésiques était suggérée mais est plutôt débattue¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

1.2.2.4. Des édulcorants artificiels

De très larges doses d'édulcorants artificiels, incluant la saccharine et les cyclamates, ont été démontrées comme carcinogènes de la vessie dans les modèles expérimentaux chez les rats. Ces données sont toutefois très controversées. Chez l'humain, les études épidémiologiques démontrent très peu d'évidence pour une association entre la consommation d'édulcorants artificiels et le risque de cancer de la vessie¹⁷⁹. En effet, une méta-analyse de toutes les études cas-témoins a démontré un risque relatif sommaire de 0.97 et le mécanisme de la carcinogénicité de la saccharine chez les rats semblait unique et différent de celui chez des humains¹⁹⁰.

1.2.2.5. Cystite chronique et infections

La cystite chronique, la présence de sondes vésicales à demeure ou de calculs vésicaux est associée à une augmentation du risque de carcinome épidermoïde de la vessie^{191, 192}. Jusqu'à 10% des paraplégiques avec sonde vésicale à demeure développent des cancers de la vessie dont 80% sont de type épidermoïde. L'incidence du cancer de la vessie ainsi que la prépondérance de type histologique épidermoïde semblent être en décroissance¹⁹³. Malheureusement, encore la moitié de ces patients ont une tumeur qui infiltre le muscle au *diagnostic*, ce qui est plus du double de la population sans traumatisme spinal¹⁹⁴. Malgré ce haut risque, un dépistage périodique par cytologie urinaire ou cystoscopie chez les patients avec sonde vésicale à demeure en absence d'hématurie macroscopique n'est pas supporté par la science^{195, 196}.

De manière similaire, la cystite associée à la schistosomiase semble causalement reliée au développement du cancer de la vessie souvent de type épidermoïde. En Égypte, où la schistosomiase est endémique surtout chez les hommes, les cancers épidermoïdes de la vessie, aussi appelés cancer vésical bilharzial, est le cancer le plus fréquent. Le microbe

Schistosoma haematobium, un trématode est endémique dans l'Europe de l'Est, l'Inde, le Portugal et l'Afrique. Les petites larves se retrouvent dans l'eau contaminée et entre par la peau. Via le système sanguin, ils vont ensuite se loger dans les plexus veineux autour de la vessie et croissent en formant des sporocystes et éventuellement se calcifient. L'incidence de cancer urothélial de la vessie est aussi augmentée chez les hommes atteints de schistosomiase¹⁹⁷.

Les cancers induits par cystite chronique sont généralement associés à des infections sévères et chroniques sur une très longue période. Les mécanismes de la carcinogenèse ne sont pas encore très bien compris mais pourraient impliquer la formation de nitrite et de composés N-nitroso dans la vessie, peut-être par les métabolismes microbiens ou parasites des constituants urinaires normaux^{198, 199}. Le lien entre l'inflammation chronique et le cancer a été davantage étudié dans le cancer de la prostate, tel que discuté dans la Section 1.1.3. et dans d'autres cancers tels que le côlon, mais un parallèle intéressant peut être fait avec la situation présentement décrite dans le cancer de la vessie où les infections chroniques sont plus facilement mesurables.

Le rôle de l'exposition au papilloma virus humain (HPV) dans le cancer de la vessie a été évalué avec des résultats contradictoires. Jusqu'à 35% des cancers de la vessie humains sont contaminés par de l'ADN HPV²⁰⁰. Les mécanismes sous-tendant cette association ne sont pas élucidés mais certains auteurs émettent l'hypothèse que la tumorigenèse du cancer urothélial associée au virus HPV se fait plutôt chez des individus immuno-compromis, plutôt que chez des individus immunologiquement compétents²⁰¹.

1.2.2.6. L'irradiation pelvienne

Quant à l'effet de la radiothérapie sur le stade et l'agressivité tumorale, on peut émettre l'hypothèse qu'un biais de détection puisse être sous-jacent à cette association. En effet, la radiothérapie entraîne des changements notables sur le tissu normal, mais particulièrement sur le tissu tumoral. Souvent, ces tumeurs sont moins vascularisées. On peut croire qu'une tumeur aussi agressive mais moins vascularisée puisse donner moins de

symptômes et donc possiblement être détectée plus tardivement qu'une tumeur aussi agressive mais ayant une vascularisation tumorale normale. En effet, cette tumeur normale sera plus à risque de se manifester par de l'hématurie et donc d'être détectée en temps opportun. Il s'agit d'un possible bel exemple de biais de détection, quoique ceci n'ait jamais été étudié ni démontré.

Les femmes traitées par radiothérapie pour un cancer du col utérin ou des ovaires ont un risque de développer un cancer de la vessie de deux à quatre fois augmenté comparé aux femmes atteintes de la même maladie mais traitées par chirurgie^{202, 203}. Cette incidence augmente davantage si de la chimiothérapie a été administrée (avec ou sans cyclophosphamide). Ce risque persiste à dix ans après l'exposition. Les tumeurs secondaires à la radiothérapie sont généralement de haut grade et localement avancées au moment du diagnostic²⁰⁴. Dans la population proche de Kiev où la contamination des sols est encore endémique depuis l'accident du réacteur de Chernobyl, des patients provenant de régions où la contamination des sols est encore importante excrètent du caesium 137 dans l'urine plus de quinze ans après l'accident nucléaire. Ceux-ci présentaient plus de lésions prolifératives et dysplasiques à la biopsie de la vessie et avaient 50% de risque de carcinoma *in situ* histologique comparativement à 0% chez les patients habitant dans les régions non contaminées²⁰⁵.

La radiothérapie pour cancer de la prostate semble aussi un facteur de risque de développement de cancer de la vessie²⁰⁶⁻²⁰⁸. Il persiste toutefois une certaine controverse qui dépend probablement des devis d'études²⁰⁹.

1.2.2.7. La cyclophosphamide

Les patients traités avec cyclophosphamide ont un risque accru par un facteur 9 de développer un cancer de la vessie, quoique cette relation spécifique n'ait pas été formellement démontrée dans des études épidémiologiques¹⁷⁹. La plupart de ces tumeurs sont de haut grade et de stade avancé au moment du diagnostic et surviennent chez des patients plus jeunes que ceux atteints d'un cancer urothélial sporadique. L'incidence

semble similaire dans les deux sexes²¹⁰. Un métabolite urinaire de la cyclophosphamide, l'acroléine, est identifié comme étant responsable à la fois de la cystite hémorragique et du développement du cancer de la vessie²¹¹. Toutefois, le développement d'une cystite hémorragique n'est pas associé au développement du cancer de la vessie²¹². La période de latence pour les cancers de la vessie induit par chimiothérapie est plutôt courte avec un éventail s'étendant de six à treize ans. Comme l'évolution de ce cancer chimio-induit est plus agressive que celle des formes de cancer vésical plus courantes, certains auteurs suggèrent même une thérapie agressive, par exemple, avec cystectomie, même si la tumeur n'infiltré pas le muscle vésical au moment du diagnostic initial²¹³.

Il est possible que la substance MESNA (2-mercapto-éthanesulfonic acid) protège contre le risque de cancer de la vessie²¹⁴.

1.2.2.8. Autres facteurs de risque

La maladie du Pied noir (*Black Foot Disease*) est une forme grave de maladie vasculaire périphérique dans laquelle les vaisseaux sanguins des membres inférieurs sont gravement endommagés, ce qui entraîne une gangrène progressive. Cette maladie est endémique dans le sud de Taiwan. Elle est associée à des maladies évidemment vasculaires périphériques et cardiaques mais aussi avec le développement de nombreux cancers incluant le carcinome urothélial de la vessie²¹⁵. La cause de cette condition semble être liée à l'ingestion de larges quantités d'arsenic qui contaminaient les puits artésiens. En effet, d'autres zones de haute incidence de cancer de la vessie sont observées dans diverses régions du monde où l'arsenic contamine l'eau potable²¹⁶. Depuis que des mesures de santé publique ont été mises en place afin d'éviter la consommation d'eau contaminée, l'incidence de cancer de la vessie semble en déclin.

Un autre facteur de risque est d'avoir reçu une transplantation rénale²¹⁷. En effet, la transplantation est un facteur de risque pour le développement de nombreuses tumeurs, possiblement à cause de l'immunosuppression prolongée²¹⁸.

Un autre facteur de risque du cancer de la vessie est d'avoir une ingestion liquidienne chroniquement basse²¹⁹. En effet, certains agents chimiques semblent responsables de l'initiation du cancer via la création de mutations génétiques ou autre. De ce fait, l'exposition prolongée et à des concentrations élevées à ces substances est plus à même d'exercer son potentiel mutagénique et carcinogénique que si la concentration de cet agent chimique est à la fois plus diluée et l'exposition plus courte. Ce qui est le cas lorsque la consommation liquidienne est plus élevée.

1.2.2.9. Le rôle de l'hérédité

Il n'y a pas d'évidence épidémiologique solide supportant l'existence d'une composante héréditaire dans la plupart des cas de cancers de vessie. Une des études les plus parlantes à ce sujet vient d'Islande où les dossiers de plus de 12,000 apparentés de 190 patients diagnostiqués avec un carcinome urothélial ont été analysés. Le risque de développer le carcinome urothélial de la vessie était plus élevé dans les apparentés (ratio de cote observé à attendu de 1.24 IC 95% de 0.9 à 1.67), ce ratio était plus élevé parmi les apparentés des deuxième et troisième degrés que chez les apparentés du premier degré. Ceci suggère fortement l'absence d'un mécanisme génétique simple sous-jacent²²⁰.

Des associations de cancer de la vessie familial ont été rapportées mais la plupart des auteurs ne spécifiait pas si cette augmentation de risque dans les familles affectées était reliée au tabagisme ou autres carcinogènes. Ceci est particulièrement important puisqu'une étude avait démontré que le risque accru de cancers de la vessie dans les familles était rencontré chez les apparentés qui fumaient²²¹.

Ces données sont toutefois ébranlées par l'explosion technologique de la génétique et de la génomique avec, dans les dernières années, une augmentation exponentielle dans les publications d'études d'associations pan-génomiques (*Genome Wide Association Studies*) pour plusieurs conditions, traits ou maladies humaines. Pour le cancer de la vessie en particulier, trois grosses études multicentriques impliquant jusqu'à environ 50,000 sujets chacune ont été publiées dans les trois dernières années. La première étude, publiée en

2008²²², a observé une forte association sur le polymorphisme nucléotidique unique (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), rs9642880 localisé sur le chromosome 8q24 près du gène Myc (ratio de cote spécifique à l'allèle = 1.22; $p=9.34 \times 10^{-12}$). Il n'y avait pas d'association entre le cancer de la vessie et les quatre variants de la région chromosomique 8q24 précédemment associés aux cancers de la prostate, du sein et colorectal. Le SNP rs9642880 n'était associé à aucun de ces cancers. Un autre signal un peu plus faible a été observé sur le SNP rs710521 [A] près du gène TP63 sur le chromosome 3q28 (ratio de cote spécifique à l'allèle = 1.19; $p=1.15 \times 10^{-7}$). La deuxième étude, publiée en 2009²²³, a associé la variation génétique de l'antigène de la cellule souche prostatique (*Prostate Stem Cell Antigen*) ou SNP rs2294008 associé au risque de cancer de la vessie. La troisième étude, publiée en 2010²²⁴, a observé une association entre le SNP rs798766 dans la région chromosomique 4p16.13 et le risque de cancer de la vessie (ratio de cote = 1.24; $p=9.9 \times 10^{-12}$). Il est intéressant de constater que ce SNP est proche du gène FGFR3 qui contient souvent des mutations somatiques activatrices du cancer de la vessie de bas grade non infiltrant. Les auteurs ont noté d'ailleurs que l'association entre le SNP rs798766 était plus forte avec le cancer de la vessie de bas grade et bas stade qu'avec les cancers plus agressifs.

En somme, ces études d'association pan-génomiques et la pléthore d'études similaires pour d'autres cancers nous permettent progressivement de mieux comprendre le rôle de la génétique humaine dans les maladies. Toutefois, ceci est un domaine très complexe et ne peut pas être encore traduit en recommandation clinique ou en santé des populations. Cette récente information crée un besoin substantiel pour des études mécanistiques aux niveaux biochimique et biologique sous-tendant ces associations. Progressivement, nous commençons à voir comment la combinaison de l'information génotypique, phénotypique et épidémiologique pourrait constituer les bases de la médecine personnalisée permettant aux cliniciens de traiter, diagnostiquer et prévenir le cancer plus efficacement²²⁵.

1.2.3. La pathologie du cancer de la vessie

Un survol des grandes classes histologiques du cancer de la vessie est important puisque toutes les formes ne peuvent pas être traitées de la même façon compte tenu des différences cliniques caractéristiques.

L'urothélium normal de la vessie est composé de trois à sept couches cellulaires d'épaisseur. Cet ensemble recouvrant une ou quelques couches de cellules intermédiaires, elles-mêmes appuyées sur une couche cellulaire basale. La couche cellulaire la plus superficielle est composée de cellules plates larges appelées parapluie qui jouent le rôle d'une barrière étanche pour contenir l'urine. Il persiste un débat quant à la certitude que les cellules parapluie constituent la couche la plus importante dans la barrière urinaire. L'urothélium est appuyé sur la lamina propria qui est une couche de cellules mésenchymateuses. Dans cette couche cellulaire, est contenue la tunique muscularis mucosa qui contient quelques fibres musculaires éparses. Ces couches sont ensuite enrobées de la couche muscularis propria contenant les couches musculaires lisses qui mènent à la contraction de la vessie ou des uretères. Les différents organes sont ensuite entourés de couches graisseuses.

Différentes anomalies histologiques peuvent être rencontrées. La première est l'hyperplasie épithéliale où on retrouve un nombre accru de couches cellulaires sans anomalie architecturale ou nucléaire. La deuxième est la métaplasie urothéliale qui réfère à des changements de la couche épithéliale superficielle dans des zones focales démontrant une apparence non transitionnelle ou non-urothéliale. Cette apparence est plus fréquemment d'apparence épidermoïde (métaplasie épidermoïde), ou glandulaire (métaplasie adénomateuse). Ces conditions sont bénignes.

En augmentant le niveau de déformation cellulaire et architecturale histologique, le prochain niveau est la dysplasie urothéliale. Plusieurs sous-types sont rencontrés. Le premier est l'hyperplasie atypique où certaines anomalies nucléaires sont retrouvées avec un dérangement partiel de la couche de cellules parapluie. Deuxièmement, la dysplasie dénote des changements épithéliaux qui sont intermédiaires entre l'urothélium normal et le

carcinoma *in situ* autrement appelé la dysplasie sévère. Troisièmement, le papillome inversé est une lésion proliférative bénigne associée à l'inflammation chronique ou une obstruction à la vidange vésicale. Ces papillomes inversés peuvent contenir des zones inflammatoires de cystitis cystica ou de métaplasie épidermoïde. De rares cas de transformation maligne de ces papillomes inversés ont été rapportés²²⁶. Quatrièmement, l'adénome néphrogénique est une lésion histologique rare qui ressemble au tubule collecteur de la forme primitive rénale. C'est une réponse métaplasique, ou autrement dit de transformation, de l'urothélium au trauma, à l'infection ou à la radiothérapie et est souvent associée aux symptômes du bas appareil urinaire d'augmentation de la fréquence mictionnelle ou de brûlure mictionnelle. Des traces inflammatoires histologiques sont fréquemment retrouvées mais il n'y a pas d'atypie nucléaire. Cinquièmement, la leucoplasie vésicale est caractérisée par une métaplasie épidermoïde avec une kératinisation marquée et une certaine atypie cellulaire. Nous croyons qu'elle est une réponse de l'urothélium normal à une agression et est considérée comme une lésion pré-maligne qui peut progresser vers le cancer épidermoïde de la vessie dans un cas sur cinq. Sixièmement, le pseudo-sarcome ou le nodule de cellules fusiformes postopératoire (*Post Operative Spinal Cell Nodule*) est une lésion rare ressemblant à un sarcome de la vessie. Il correspond à une réaction de prolifération réactionnelle survenant plusieurs mois après une procédure chirurgicale ou une infection du bas appareil urinaire. Elles peuvent être facilement confondues pour une lésion maligne voire avec des léiomyosarcome de la vessie^{227, 228}.

1.2.3.1. Le carcinome urothélial

Ce qui était appelé le carcinome transitionnel est maintenant appelé le carcinome urothélial préférentiellement depuis la Conférence consensus des pathologistes du WHO et de l'ISUP²²⁹. Le carcinome urothélial diffère de l'urothélium normal par un nombre élevé de couches cellulaires épithéliales avec des replis papillaires de la muqueuse, une perte de la polarité cellulaire, une maturation anormale des différentes couches cellulaires, des anomalies nucléaires ainsi que la présence de figures mitotiques nucléaires.

Le grade tumoral est un facteur important. Bien qu'il n'y avait pas de système de gradation uniforme, la Conférence consensus du WHO et de l'ISUP ont permis de simplifier les multiples classifications. Une association forte existe entre le grade et le stade de la tumeur : la plupart des tumeurs bien et modérément différenciées sont de stade superficiel, alors que la majorité des tumeurs pauvrement différenciées sont de stade infiltrant. Il y a de plus en plus d'évidences cytogénétiques et moléculaires qui supportent l'impression clinique bien établie que les tumeurs de bas grade et que les tumeurs de haut grade ont des origines fondamentalement différentes : les formes de bas grade sont associées à perte d'un ou plus des gènes suppresseurs tumoraux sur le chromosome 9q alors que les formes de haut grade sont associées à des anomalies des gènes p53, Rb et p16 comme événements précoces²³⁰⁻²³³.

Les atypies cellulaires caractéristiques du cancer sont retrouvées en quantités croissantes au fur et à mesure que l'on change de catégories pathologiques: les tumeurs urothéliales papillaires à faible potentiel malin, le carcinome urothélial de bas grade et enfin le carcinome urothélial de haut grade. Ceci correspond à un grade histologique 3 sur 3 dans l'ancienne classification histologique. On retrouve une perte d'architecture significative avec une perte de la différenciation normale de la membrane jusqu'à la surface. Il y a un pléomorphisme nucléaire important avec un ratio noyau/cytoplasme très élevé. Les figures mitotiques atypiques sont fréquentes.

La simplification de ce système de gradation pathologique permet aussi de regrouper les patients entre eux afin de mieux définir leur risque de progression tumorale.

1.2.3.1.1. Le carcinome in situ

Le carcinome *in situ* peut apparaître comme un placard érythémateux au niveau de la muqueuse mais a souvent une apparence endoscopique entièrement normale. Histologiquement, il consiste en un carcinome urothélial pauvrement différencié confiné à l'urothélium. C'est le niveau maximal de dysplasie possible sans qu'une infiltration des cellules dysplasiques ou cancéreuses dans les couches plus profondes de la vessie ne soit

observée. Le carcinome *in situ* est souvent asymptomatique mais peut parfois produire des symptômes sévères du bas appareil urinaire, de fréquence, d'urgenturie et de brûlures mictionnelles. On rapporte des anomalies à la cytopathologie urinaire positive dans 80 à 90% des carcinomes *in situ* parce que ces cellules tumorales ont tendance à se détacher plus facilement du reste de l'urothélium.

Le carcinome *in situ* est présent chez au moins 25% des patients qui ont des tumeurs superficielles de haut grade et représente un facteur de risque important pour la progression tumorale vers une maladie infiltrant le muscle; ceci surviendra dans entre 40 à 83%²³⁴.

1.2.3.2. Le carcinome épidermoïde

Le carcinome épidermoïde consiste de manière caractéristique en des îlots kératinisés qui contiennent des agrégats excentriques de cellules appelées des perles épidermoïdes, des perles squameuses. Ce degré de différenciation histologique peut varier. Le degré de différenciation histologique corrèle moins bien avec le pronostic stade pour stade qu'il ne corrèle dans cette même situation pour le carcinome urothélial²³⁵. Comme pour le cancer urothélial agressif, le cancer épidermoïde présente souvent des anomalies des gènes TP53 et p16²³⁶.

Le cancer épidermoïde a une étiologie particulière et sa prévalence varie beaucoup d'un pays à l'autre. Elle représente seulement 1% des cancers de la vessie en Angleterre, environ 5% aux États-Unis, mais jusqu'à 75% des cancers en Égypte²³⁷⁻²⁴⁰. Ces cancers surviennent en général dix à 20 ans plus jeunes que les patients atteints de carcinome urothélial. Le cancer bilharzial est associé à l'infection chronique à *schistosoma haematobium*. Le cancer bilharzial est souvent exophytique, nodulaire et normalement bien différencié. Il a un faible taux d'incidence de métastases ganglionnaires et à distance. Ceci est possiblement causé soit par une fibrose des capillaires sanguins et lymphatiques secondaires à l'infection chronique schistosomiale ou à des lésions de plus bas grade. Le cancer épidermoïde non-bilharzial est associé aux formes chroniques d'irritations et d'inflammation de la vessie tels que des calculs vésicaux, des cathéters, des sondes

vésicales à demeure, des infections urinaires chroniques ou des diverticules de la vessie. Jusqu'à 80% des paraplégiques avec infections vésicales chroniques ou sondes vésicales à demeure ont des changements épidermoïdes de la vessie, toutefois seulement 5% de ces patients développeront un cancer épidermoïde de la vessie¹⁹⁵.

1.2.3.3. Adénocarcinome

L'adénocarcinome représente moins de 2% des cancers primaires de la vessie. Les adénocarcinomes peuvent aussi survenir dans les formes de reconstructions urinaires telles que les conduits, les augmentations vésicales, ou les réservoirs urinaires et les dérivations urinaires par urétérosigmoïdostomie. Ils peuvent aussi provenir de la vessie primairement, de l'ouraque ou être métastatiques²⁴¹.

L'adénocarcinome vésical primaire peut être associé à l'extrophie vésicale, mais il apparaît plus fréquemment en réponse à une inflammation chronique et à une irritation. La plupart des adénocarcinomes sont pauvrement différenciés, invasifs et infiltrants. Ils sont aussi souvent associés à une inflammation de type cystitis glandularis qu'à du carcinoma *in situ*. Ils représentent généralement un pronostic sombre principalement à cause de leur stade avancé au diagnostic; il y a très peu d'évidence qui indique que stade pour stade, le pronostic soit particulièrement différent de celui des autres formes de cancer urothélial.

Le cancer de l'ouraque est une forme extrêmement rare de tumeurs qui survient en dehors de la vessie, dans le ligament qui joint la vessie à l'ombilic (ouraque). Ces cancers sont normalement des adénocarcinomes quoiqu'on observe rarement des cancers primaires de l'ouraque de forme urothéliale ou épidermoïde, ou, plus rarement encore, sarcomateuse. Histologiquement, ces tumeurs exhibent une infiltration profonde de la paroi vésicale ce qui peut parfois compromettre les résultats d'une cystectomie partielle. Elles peuvent donner des symptômes d'écoulements mucoïdes ou sanguinolents par l'ombilic, donner une masse palpable près de l'ombilic qui représente un mucocèle ou parfois présenter de l'hématurie ou du mucus dans les urines. Compte tenu de leur localisation, le carcinome de l'ouraque

peut métastasier par des voies ganglionnaires particulières incluant les ganglions inguinaux, iliaques, l'omentum, le foie, les poumons et les os²⁴².

L'adénocarcinome peut être métastatique à la vessie et ceci représente la forme d'adénocarcinome vésicale la plus fréquente. Les sites primaires d'où proviennent ces tumeurs incluent le rectum, l'estomac, l'endomètre, le sein, la prostate et les ovaires.

1.2.3.4. Les tumeurs non-urothéliales de la vessie

D'autres types de tumeurs épithéliales peuvent survenir dans la vessie mais à une fréquence faible. L'ensemble des autres types de tumeurs décrits ci-après représente moins de 1% de la proportion de toutes les tumeurs vésicales.

Le carcinome à petites cellules est probablement dérivé des cellules souches neuro-endocrines ou dentritiques de la vessie. Ces tumeurs expriment les marqueurs neuro-endocrines comme une expression positive de l'énolase neurone spécifique. Ces tumeurs sont généralement biologiquement très agressives avec un envahissement vasculaire et musculaire précoce dans l'évolution de la maladie. Celles-ci peuvent provenir de la vessie mais l'origine initiale peut également être les poumons ou la prostate, sites qui peuvent fréquemment métastaser ou envahir la vessie²⁴³. En général, les patients atteints de ces maladies sont traités agressivement de manière multimodale en incluant de la chimiothérapie le plus souvent suivie d'une cystectomie radicale, et parfois de radiothérapie.

Le carcinosarcome est une tumeur maligne contenant des éléments épithéliaux et mésenchymateux malins. Ce mélange de types tumoraux peut contenir les éléments mésenchymateux normalement représentés par du chondrosarcome ou de l'ostéosarcome, alors que les éléments épithéliaux sont soit du carcinome urothélial, du carcinome épidermoïde ou de l'adénocarcinome. Ces tumeurs sont rares et surviennent normalement chez les hommes d'âge moyen, donc un peu plus jeunes que ceux atteints du carcinome urothélial typique. Le pronostic de ce type de tumeurs est uniformément sombre malgré un traitement multimodal agressif.

Le carcinome métastatique est fréquemment rencontré à la vessie. Virtuellement tout autre site primaire peut métastaser à la vessie; toutefois, les sites les plus fréquents sont la prostate, l'ovaire, l'utérus, le côlon, le rectum, le poumon, le sein, le rein et l'estomac. Les maladies primaires à d'autres sites de mélanome, de lymphome et de leucémie peuvent aussi affecter la vessie.

1.2.3.5. Les tumeurs non-épithéliales de la vessie

De 1 à 5% de toutes les tumeurs vésicales sont d'origine non-épithéliale. Les plus communes sont décrites ici.

Le neurofibrome est une tumeur bénigne qui provient des gaines nerveuses et résulte d'une surcroissance des cellules de Schwann. Les neurofibromes multiples peuvent survenir dans un contexte héréditaire autosomal dominant appelé la neurofibromatose. L'évolution de ces tumeurs est normalement bénigne et ne dégénère que très rarement en neurofibrosarcome malin. L'atteinte vésicale peut se manifester cliniquement chez les enfants ou chez les jeunes adultes avec des symptômes du bas appareil urinaire ou de masses pelviennes.

Le phéochromocytome peut se loger dans la vessie et représente moins de 1% des tumeurs vésicales et moins de 1% des phéochromocytomes. Ces tumeurs ont pour origine des cellules para-ganglionnaires à l'intérieur de la paroi vésicale fréquemment près du trigone. Le pic d'incidence de ces tumeurs se retrouve dans la deuxième à la quatrième décade. Une transformation maligne peut survenir dans environ 10% des cas et peut même donner des métastases ganglionnaires ou à distance. Les phéochromocytomes de la vessie sont normalement actifs sur le plan hormonal et causent les symptômes typiques d'hypertension paroxystique ou de syncope au remplissage ou à la vidange de la vessie chez la majorité des patients. La connaissance de ce type rare de tumeurs et de son syndrome clinique est importante, puisque les patients doivent subir une évaluation et une préparation préopératoire plus importante que les autres compte tenu des crises hypertensives sévères que la chirurgie pourrait déclencher.

Le lymphome primaire de la vessie est le deuxième type le plus commun de tumeurs vésicales non-épithéliales. Il se traite comme un lymphome diagnostiqué à un autre site, par chimiothérapie.

Les autres sous-types tumoraux de la vessie sont beaucoup plus rares et représentent soit des sarcomes, des angiosarcomes, des léiomyosarcomes et des rhabdomyosarcomes. Ce dernier sous-type est d'intérêt clinique puisqu'il se présente caractéristiquement que chez les enfants et produit des lésions polypoïdes à la base de la vessie qui ont l'apparence d'une grappe de raisins. Ces tumeurs sont donc appelées le sarcome *botryoides*.

1.2.4. Histoire naturelle du cancer de la vessie

Dans les pays occidentaux, de 55 à 60% de tous les cancers de la vessie nouvellement diagnostiqués, sont des cancers urothéliaux (transitionnels) bien à modérément différenciés, superficiels (c'est-à-dire n'infiltrant pas la muscularis propria) et papillaires. Après traitement initial par résection endoscopique, la majorité de ces patients développeront une récurrence tumorale, avec 16 à 25% qui auront un grade tumoral plus élevé^{234, 244}. Une proportion de 10 à 20% des patients avec tumeurs vésicales superficielles développeront subséquemment un cancer de la vessie infiltrant ou métastatique^{234, 245}. Il n'est pas rare qu'après une période de rémission sans récurrence tumorale jusqu'à cinq ans, même quand la tumeur indexée était bien différenciée et superficielle, que les récurrences tardives soient envahissantes^{246, 247}.

De manière importante, de 40 à 45% des cancers de la vessie nouvellement diagnostiqués sont des lésions de haut grade dont la moitié ou un peu plus infiltrent d'emblée le muscle ou sont plus extensives au moment du diagnostic^{194, 248}. Les tumeurs de haut grade superficielles ont un risque beaucoup plus élevé de récurrence et un risque beaucoup plus grand de développer une maladie infiltrant le muscle et métastatique que celles de bas grade superficielles^{194, 249-251}. L'évidence cliniquement prépondérante suggère que le carcinome urothélial a deux variantes majeures : le bas grade versus le haut grade, qui peuvent être déterminées par l'examen cystoscopique routinier²⁵² et la résection

endoscopique ainsi que l'analyse histopathologique. Même les patients avec des tumeurs de bas grade peuvent éventuellement développer des récidives de plus haut grade^{244, 246, 247}. En contrepartie, des tumeurs de haut grade complètement réséquées récidivent fréquemment en tant que tumeurs de bas grade²⁵³, il n'est pas rare d'observer de manière concomitante des lésions de haut grade et de bas grade simultanément dans la même vessie. Des exceptions au profil biphasique plus typique du carcinome urothélial ne sont vraiment pas rares et plusieurs évidences épidémiologiques moléculaires et génétiques suggèrent en fait qu'il y a des similarités – et présumément des points communs d'origine – entre la maladie de haut grade et de bas grade²⁵³⁻²⁵⁶.

Il est important de noter que presque un patient sur quatre avec un cancer de la vessie nouvellement diagnostiqué a une maladie infiltrant le muscle, la majorité de ceux-ci étant des tumeurs de haut grade histologique^{194, 248}. La majorité des patients avec une tumeur infiltrant le muscle vésical ont déjà ce niveau d'envahissement au moment du diagnostic initial²⁵⁷⁻²⁶⁰. Jusqu'à 50% des patients avec un cancer de la vessie infiltrant la couche musculuse ont déjà une maladie métastatique à distance qui souvent est occulte. Ceci compromet évidemment l'efficacité des thérapies locales ou régionales pour les tumeurs envahissantes. La plupart des métastases occultes deviennent cliniquement évidentes à l'intérieur d'une année.

1.2.4.1. Les indicateurs pronostiques

De nombreux indicateurs cliniques et des tests de laboratoire ont été étudiés comme des moyens potentiels de prédire l'évolution d'un cancer de la vessie de manière individuelle pour les patients. Pour que ces tests aient une valeur pronostique significative, ils doivent ajouter une capacité prédictive aux modèles cliniques et pathologiques standards et ils doivent avoir une valeur indépendante. Ceci peut être examiné par l'analyse multivariée afin de déterminer la valeur pronostique indépendante du marqueur à l'étude. Il est aussi important de noter qu'un bon nombre de ces marqueurs sont encore seulement au stade de recherche et n'ont pas atteint l'utilité clinique uniformisée.

1.2.4.1.1. Les paramètres pathologiques et cliniques

Les paramètres pronostiques les plus utiles pour évaluer le risque de récurrence tumorale et de progression oncologique subséquente chez les patients avec tumeurs superficielles de la vessie sont le grade de la tumeur, la profondeur de la pénétration tumorale ou le stade tumoral, l'envahissement lymphatique, la grosseur tumorale, la dysplasie urothéliale ou la présence de carcinoma *in situ* ailleurs dans la vessie, l'architecture tumorale solide versus papillaire, la multifocalité, et la fréquence de la récurrence tumorale²⁶¹⁻²⁶³. Les plus importantes parmi celles-ci sont le grade, le stade et la présence de carcinoma *in situ*^{264, 265}. Chez les patients avec carcinome urothélial envahissant la lamina propria (stade T1) et de haut grade, au moins une personne sur trois aura une progression oncologique à un stade infiltrant le muscle, même avec résection endoscopique complète et traitement intravésical avec le Bacille Calmette-Guérin^{249, 264, 266}.

1.2.4.1.2. Les paramètres de laboratoire

Une panoplie de paramètres de laboratoire a été étudiée pour leur signification pronostique. Même si plusieurs associations avec la progression tumorale ont été démontrées, aucun de ces tests n'a été adopté en pratique clinique courante et n'influence donc pas pour le moment les décisions de traitement pour chaque patient. Toutefois dans les environnements de recherche, la valeur pronostique réelle des marqueurs les plus étudiés (par exemple l'accumulation nucléaire de TP53) est entrain d'être étudiée prospectivement dans des études randomisées²⁶⁷.

1.2.5. Le traitement du cancer superficiel de la vessie

1.2.5.1. Traitement intravésical

1.2.5.1.1. Immunothérapie intravésicale

L'immunothérapie intravésicale résulte d'une réponse massive immunitaire locale qui résulte en une expression de cytokine dans l'urine et dans la paroi vésicale ainsi qu'un influx de granulocyte et de cellule mononucléaire. La réponse immunitaire cellulaire et

humorale est bien étudiée. Un canadien, Morales, a découvert l'activité antitumeur d'une mycobactérie atténuée le Bacille Calmette-Guérin²⁶⁸. Il s'agit de la même souche bactérienne atténuée qui sert à fabriquer les vaccins antituberculeux. Le vaccin est reconstitué dans du salin physiologique et est administré par un cathéter vésical dans la vessie. Idéalement, le patient doit garder la solution intravésicale pendant deux heures. On attend normalement d'un minimum de deux à quatre semaines après une résection tumorale afin de permettre à la vessie de compléter son processus de ré-épithélialisation, pour minimiser le potentiel d'intravasation de la bactérie vivante. D'ailleurs, dans l'enlèvement d'un cathétérisme traumatique, on retarde l'instillation vésicale de quelques semaines.

L'immunothérapie par BCG est la plus efficace pour le traitement du carcinoma *in situ*. Le BCG fait maintenant partie des lignes directrices américaines et européennes comme option thérapeutique préférée pour le carcinoma *in situ*.

L'immunothérapie par BCG intravésicale peut aussi traiter des tumeurs papillaires résiduelles mais ne devrait pas constituer un substitut pour une résection chirurgicale optimale. Certains ont rapporté jusqu'à 60% de réponse tumorale.

L'immunothérapie par BCG est aussi indiquée comme traitement prophylactique pour prévenir la récurrence tumorale. L'efficacité du BCG après résection endoscopique complète pour les tumeurs papillaires à haut risque a été démontrée dans de nombreuses séries avec cancer urothélial de stade T1 où les taux de récurrences variaient de 16 à 40% et les taux de progression de 4 à 40%. On trouvait une amélioration importante de l'addition du BCG pour les tumeurs de haut risque comparativement à la résection endoscopique seule^{121, 249, 269}.

L'immunothérapie par BCG intravésicale a aussi un impact sur la progression tumorale. Bien que l'impact du BCG sur la récurrence tumorale est important et intéressant, l'impact le plus grand quant à la perspective de survie demeure l'impact sur la progression de la maladie, puisque ceci amène à un risque de décès par cancer de la vessie substantiellement plus élevé. Deux méta-analyses individuelles et récemment publiées en sont venues à la conclusion que le BCG réduit significativement le risque de progression tumorale. Ces méta-analyses ont mesuré une réduction de 27% dans le risque de

progression tumorale à 2.5 ans²⁷⁰ et une réduction de 23% à 26 mois dans une autre étude²⁷¹. Dans les deux cas, le BCG de maintien en plus du BCG d'induction étaient importants.

Ceci contraste clairement avec l'ensemble des essais cliniques de chimiothérapie intravésicale où des réductions significatives de la progression tumorale n'ont jamais été démontrées. Il n'en demeure pas moins que la preuve de l'avantage de survie de l'immunothérapie par BCG intravésical demeure hypothétique.

1.2.5.1.2. Les modes de traitement par BCG intravésical

Plusieurs études ont démontré qu'un traitement d'induction par BCG intravésical hebdomadaire sur une durée de six semaines était important mais aussi suffisant pour obtenir une réponse immunitaire optimale²³¹.

Compte tenu du mécanisme immunitaire anticancéreux sous-jacent à cette forme de traitement, un traitement de maintien a été démontré nécessaire. Le régime de maintien le plus utilisé cliniquement est celui du SWOG soit le Southwest Oncology Group qui a rapporté sur leurs formes de traitements. Les patients recevaient une induction de six traitements hebdomadaires puis le traitement de maintien était constitué de trois instillations hebdomadaires à trois et six mois, puis aux six mois par la suite. Ceci jusqu'à trois ans après la résection initiale. La survie sans récurrence tumorale médiane estimée était de 77 mois dans le bras avec traitement de maintien versus 36 mois dans le bras contrôle avec traitement d'induction seulement ($p=0.0001$). Toutefois, une proportion significative de patients ne tolère pas ce régime de traitement à dose complète. Seulement 16% des patients ont toléré le régime complet. Les deux tiers des patients qui ont arrêté le BCG à cause d'effets secondaires l'ont fait durant les premiers six mois suggérant une tolérabilité idiosyncrasique variant d'un individu à l'autre plutôt qu'une toxicité cumulative. Pour cette raison, plusieurs investigateurs ont évalué le potentiel de réduire la dose du BCG^{230, 272-274}. En général, une diminution de la toxicité est observée sans différence significative de l'efficacité dans la plupart de ces petites séries. Toutefois, les tumeurs à plus haut risque

de récurrence, soit les tumeurs multifocales de haut grade semblent répondre plus fortement à une dose pleine.

Afin de maximiser la réponse immunitaire dans le traitement de BCG intravésical, la combinaison de BCG avec l'interféron paraissait une alternative attrayante. Les interférons sont des glycoprotéines produites en réponse aux stimuli antigéniques, ils peuvent avoir une activité antitumorale. Parmi les plusieurs sous-types d'interférons, l'interféron- α est celui qui a été le plus étudié et il semble avoir la réponse antitumorale la plus forte. Toutefois, la dose optimale et le mode d'administration n'ont pas encore été déterminés²⁷⁵.

Plusieurs études publiées suggèrent que l'interféron comme seul agent est plus coûteux et moins efficace que le BCG, ou que la chimiothérapie intravésicale autant pour éradiquer la maladie résiduelle, que pour prévenir la récurrence tumorale, ainsi que pour traiter le carcinoma *in situ*^{232, 275}. Pour la maladie naïve au BCG, une étude a démontré que le bacille Calmette-Guérin a une efficacité oncologique supérieure à une combinaison de chimiothérapie avec interféron- $\alpha 2b$ ²⁷⁶. Aussi pour le carcinome urothélial naïf au BCG, la combinaison BCG et interféron a un effet identique au BCG seul, de plus les effets secondaires étaient plus marqués chez les patients recevant la combinaison avec interféron- $\alpha 2b$ ²⁷⁷. Malgré les risques élevés d'une maladie réfractaire au BCG, la seule niche potentiellement restante pour la combinaison interféron- α avec BCG demeure cette même maladie réfractaire au BCG. En effet la bi-thérapie interféron- α avec BCG pourrait diminuer les effets secondaires tout en ayant un potentiel d'efficacité similaire.

1.1.5.1.3. Chimiothérapie intravésicale

La plus grande utilité de la chimiothérapie intravésicale est la thérapie d'induction où l'agent est instillé dans la vessie six heures ou moins après la résection endoscopique initiale. Ceci a un impact clinique important sur le taux de récurrence tumorale. La mitomycine C semble être l'agent intravésical adjuvant chimiothérapeutique le plus efficace à être utilisé en contexte périopératoire. Le mécanisme d'action proposé est qu'il

prévient l'implantation des cellules tumorales immédiatement après résection endoscopique de la tumeur vésicale. Une seule dose de mitomycine C donnée à l'intérieur des six heures après la résection endoscopique initiale est efficace^{278, 279}. De manière consistante avec le mécanisme d'action proposé, plus la chimiothérapie adjuvante est donnée précocement après la chirurgie, plus elle est efficace : vingt-quatre heures après la résection initiale, la mitomycine n'est plus efficace pour prévenir la réduction tumorale^{205, 280, 281}. La thérapie de maintenance ne semble pas efficace^{282, 283}. Le rôle de la chimiothérapie comme agent adjuvant de maintenance n'est donc pas clair. En particulier, une étude du SWOG a comparé la doxorubicine au BCG avec 15% de progression chez les BCG versus 37% de progression dans le groupe doxorubicine²⁸⁴.

Toutefois, le risque de complications infectieuses au BCG n'existe pas avec les agents chimiothérapeutiques. Ceci fait pencher la balance en faveur de cette approche pour de nombreux urologues surtout européens.

L'agent chimiothérapeutique intravésical comme traitement adjuvant du cancer urothélial le plus étudié demeure la mitomycine C. De nombreuses études ont été publiées qui ont été révisées dans une méta-analyse²⁸⁵. Le taux d'efficacité serait similaire mais en faveur du BCG particulièrement quant à la progression tumorale. La mitomycine C est plus efficace qu'aucun traitement mais moins efficace que le BCG.

Différents modes d'administration de ce traitement ont été étudiés et une augmentation de la concentration du produit, une diminution de l'urine résiduelle avec un jeun hydrique la nuit précédant le traitement ainsi qu'une alcalinisation de la substance injectée avec du bicarbonate de sodium ont toutes été prouvées bénéfiques²⁸⁶.

La doxorubicine (adriamycine) fait partie de la classe des agents chimiothérapeutiques antibiotiques et inhibe la synthèse protéique. Une publication²²⁰ a démontré que la doxorubicine était plus efficace que la résection endoscopique seule pour prévenir la récurrence, mais ne semblait pas avoir d'effets en termes de prévention de progression tumorale. Les dérivés de la doxorubicine sont l'épirubicine et la valrubicine.

Ces agents semblent grossièrement aussi efficaces que la mitomycine C et certaines études suggèrent même que les effets secondaires pourraient être moindres. Toutefois, ces agents ont été moins étudiés.

Le thiotepa (triethylenethiophosphoramide) a été le premier agent approuvé pour le traitement intravésical du cancer de la vessie. Il est en fait encore le seul agent approuvé par la FDA américaine à ce titre. C'est un autre agent alkylant. Son efficacité pour diminuer la récurrence tumorale par environ 40% est prouvée. Toutefois, les effets secondaires systémiques sont importants compte tenu que la petite taille moléculaire de 189 Kd résulte en une absorption systémique de cette substance²⁸⁷.

1.1.5.2. Cancer de la vessie réfractaire au traitement adjuvant intravésical

La maladie persistante récidivante après un traitement initial d'induction par BCG intravésical est définie de manière consensuelle comme BCG réfractaire, BCG résistante ou BCG récidivante¹⁹⁷.

Comme la maladie progressant a un risque de mortalité substantiel, les patients avec maladie BCG réfractaire sont dans un groupe particulièrement à haut risque et devraient considérer un traitement de cystectomie immédiate, surtout s'ils sont jeunes et en général en bonne santé. Toutefois, comme le traitement par cystectomie radicale est un traitement invasif qui peut faire peur à de nombreux patients et même parfois à certains urologues, les patients qui ont une maladie réfractaire à un traitement intravésical sont souvent traités avec résection répétée et traitement intravésical répété. Nous notons, au Québec et au Canada en général, un taux très élevé de tumeur de stade localement avancé suggérant effectivement que des traitements plus agressifs seraient possiblement plus efficaces si instaurés plus précocement.

Malgré le traitement local, une proportion élevée de maladies n'infiltrant pas le muscle mais étant de haut grade va progresser jusqu'au stade d'envahissement musculaire. Le patient va alors risquer la mort par cancer de la vessie. Les patients qui ont une maladie

BCG réfractaire ont 50% de chance de progression de la maladie et donc un risque de mortalité par leur propre cancer.

Les patients avec cancer de la vessie de stade pT1 qui récidivent précocement après la BCG (à trois mois) ont un taux de progression pouvant aller jusqu'à 82% comparativement à 25% de taux de progression chez ceux qui échouent plus tardivement¹²⁰. Jusqu'à 20% des patients qui ont un carcinome *in situ* de la vessie vont décéder de leur carcinome urothélial à dix ans¹⁸⁴. Chaque survenue d'une tumeur T1 est associée à un risque de 5 à 10% de métastases²⁸⁸. Toutes ces évidences confirment donc le risque de sous-estimer le statut de la maladie surtout chez les patients à haut risque.

La cystectomie radicale, en plus d'offrir un potentiel curatif, est aussi l'option de stadification pathologique la plus précise et donc devrait, dans certaines conditions, être recommandée aux patients qui ont une tumeur de haut grade surtout de stade T1, même si elle n'infiltré pas le muscle propre de la vessie. Principalement, si les tumeurs exhibent un envahissement lympho-vasculaire ou sont associées à du carcinoma *in situ* diffus, ou sont situées dans un diverticule ou impliquent une proportion substantielle des uretères distaux ou de l'urètre prostatique et enfin surtout si ces tumeurs sont réfractaires au traitement intravésical. Compte tenu des risques significatifs de cette maladie, la cystectomie peut aussi être utilisée chez des patients qui comprennent les risques et les bénéfices de la préservation vésicale versus la cystectomie et qui requièrent un traitement définitif²⁸⁹. Ceci n'est clairement pas l'approche qui a été mise en place au Québec compte tenu des risques significatifs de la cystectomie radicale.

Une étude récente²⁹⁰ a quantifié le bénéfice de survie d'une cystectomie dite précoce versus différée pour les patients avec cancer de la vessie de haut grade de stade pT1 réfractaire au traitement intravésical. Ils ont mesuré le taux de survie spécifique au cancer de la vessie à dix ans à 70% dans le groupe de cystectomie dite précoce versus, 65% dans le groupe de cystectomie radicale différée.

De nombreuses autres options sont présentement en cours d'investigation pour les patients avec une maladie réfractaire au traitement intravésical. Ces options devraient clairement faire partie de protocoles de recherche puisqu'elles ne sont pas prouvées.

1.3. Lipides et cancers urologiques : une hypothèse commune

1.3.1. Les lipides et le cancer en général

Depuis environ deux décennies, la relation entre les lipides et le cancer intéresse la communauté scientifique²³³ et demeure encore débattue malgré de nombreux avancements méthodologiques. La nature complexe multifactorielle des cancers sous-tend probablement l'hétérogénéité des résultats observés, les lipides, en général, sont composés de nombreux sous-types qui représentent eux-mêmes une partie importante de l'énergie totale consommée dans la diète.

Les lipides totaux sont en général en association positive avec les cancers de tout type. En autant que les lipides sont reliés à l'obésité, qui elle-même est aussi reliée à l'incidence de cancer, la plausibilité biologique est acceptable.

Les graisses d'origine animale, saturées et mono-insaturées, présentent un patron d'association moins clair, quoique moins d'études se soient penchées sur le sujet. Les acides gras saturés semblent augmenter le risque de progression du cancer de la prostate dans de rares études.

Les graisses polyinsaturées en général ne démontrent pas d'association franche avec l'incidence de cancers de tout type. Ceci est contraire aux modèles animaux qui démontrent une association positive entre ces graisses et le cancer.

Les acides gras polyinsaturés oméga-3 d'origine marine (à chaîne longue) semblent démontrer la plus probable réduction de risque de cancer globalement. Toutefois ceci est fortement corrélé avec la consommation de poisson gras particulièrement. En ce sens, la confusion résiduelle avec d'autres nutriments provenant du poisson ne peut pas être

exclue. La confusion résiduelle par d'autres habitudes diététiques, par exemple comme la substitution de la viande rouge par le poisson, ou même plus globalement par d'autres habitudes de vie reliées à une diète plus saine et en particulier la consommation de poisson, pourrait confondre cet effet.

Ainsi, il est difficile de faire une recommandation à l'échelle de la santé publique compte tenu que les études interventionnelles expérimentales n'ont pas encore démontré de bénéfice.

Les acides gras trans semblent suggérer un effet positif avec le cancer. Quelques études mécanistiques dans le cancer de la prostate supportent particulièrement cette hypothèse. Quoiqu'il en soit, les données ne sont pas assez nombreuses pour permettre une conclusion à cet égard.

1.3.2. Les lipides et le cancer de la vessie

Bien que la quantité d'études s'étant portée sur le lien entre les lipides et le cancer de la vessie est beaucoup moindre que pour d'autres cancers, en particulier celui de la prostate, nous commençons toutefois à avoir une idée grossière de ses effets.

Certains éléments diététiques sont associés à un risque accru de cancers de la vessie et incluent le porc, des viandes cuites au barbecue, les graisses, le soya et l'excès de consommation de café. Ici aussi, des essais cliniques n'ont pas été réalisés, mais certains éléments nutritionnels semblent être prometteurs et pourraient être considérés dans les soins des patients avec cancer de la vessie.

La quantité de liquide apparaît importante pour le cancer de la vessie et ceci est dû au mécanisme de la carcinogenèse qui est particulier à cet organe. En effet, les carcinogènes qui sont excrétés dans l'urine demeurent dans la vessie pour une durée variable qui dépend directement de la quantité de liquide ingérée. Plus un individu consomme de liquide, moins longtemps l'urine et son contenu potentiel en carcinogènes seront en contact avec la vessie puisque la fréquence mictionnelle sera augmentée. Aussi, les liquides ingérés diluent les potentiels carcinogènes, minimisant donc l'intensité de

contact avec la muqueuse vésicale. Toutefois, les résultats épidémiologiques sont en opposition : environ le même nombre d'études rétrospectives ont démontré une association négative que positive entre la quantité de liquide ingérée et le risque de cancer de la vessie. Ceci peut être un exemple de la difficulté de la mesure d'une exposition. Ceci pourrait illustrer des erreurs de classement non différentielles qui tendent à rapprocher la mesure vers la nulle, tout comme les études positives pourraient être teintées du biais de mémoire.²⁹¹

Très peu d'études se sont attardées spécifiquement au lien entre les lipides de la diète et le cancer de la vessie. Une méta-analyse survolant l'ensemble des facteurs diététiques et le risque de cancer de la vessie suggère une association positive entre la quantité de lipides et le risque de cancer de la vessie.²⁹² Une association indirecte pouvant être faite est celle passant par l'obésité : une étude récente a démontré une augmentation du risque de cancer de la vessie de 28% chez des individus obèses comparé aux individus non obèses.²⁹³

1.3.2. Les lipides et le cancer de la prostate

Cet article de revue de la littérature intitulé « Omega-3 Fatty Acids, Genetic Variants in COX-2 and Prostate Cancer » a été publié dans le *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* en 2009²⁹⁴. Je suis le deuxième auteur ayant contribué à cet article de revue. J'ai travaillé sur toutes les étapes de la conception à la rédaction du manuscript en passant par l'interprétation des données.

Omega-3 Fatty Acids, Genetic Variants in COX-2 and Prostate Cancer

Adam C. Reese¹, Vincent Fradet¹, John S. Witte^{1,2,3}

Departments of ¹Urology and of ²Epidemiology and Biostatistics, and ³Institute for Human Genetics, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, 94143-0794, USA

Address for correspondence:

John S. Witte

Departments of Epidemiology & Biostatistics and Urology

Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center

University of California, San Francisco

Diller Bldg, Room 388, 1450 3rd Street, MC 3110

San Francisco, CA 94158-9001

Tel: 415-502-6882

Fax: 415-476-1356

Running Head: COX-2, Omega-3, and Prostate Cancer

Keywords: prostatic neoplasms, diet, polyunsaturated fatty acids, omega-3 fatty acids, cyclooxygenase 2, gene, genetic variation, single nucleotide polymorphism

Abstract

Dietary intake of fish and omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) may decrease the risk of prostate cancer development and progression to advanced stage disease. This could reflect the anti-inflammatory effects of PUFAs, possibly through mediation of cyclooxygenase (COX), a key enzyme in fatty acid metabolism and inflammation. Despite promising experimental evidence, epidemiological studies have reported somewhat conflicting results regarding the effects of fish/PUFAs on prostate cancer development and progression. The literature suggests that fish, and particularly long-chain n-3 PUFAs, may have a more pronounced protective effect on biologically aggressive tumors or on their progression, and less on early steps of carcinogenesis. Moreover, the impact of LC n-3 PUFAs may be modified by variation of the COX-2 gene. Overall, results to date support the hypothesis that long-chain n-3 PUFAs may impact prostate inflammation and carcinogenesis via the COX-2 enzymatic pathway.

Introduction

Prostate cancer is the most common non-cutaneous malignancy diagnosed in men²⁹⁵. In 2009 alone, there are projected to be 191,000 new cases of prostate cancer in the United States, accounting for approximately 25% of new cancer diagnoses²⁹⁵. There are a few well-accepted risk factors for prostate cancer, including family history, African-American ethnicity, and particular genetic variants. However, a large percentage of men with prostate cancer do not carry these risk factors, suggesting that there remain important unexplained components to the pathogenesis of disease. Potential environmental risk factors for prostate cancer, including the effects of diet, have shown mixed results. Nevertheless, identifying environmental risk factors for prostate cancer carcinogenesis, and studying gene-environment interactions, are critically important to advance our understanding of the biology of this disease, and to aid in the development of potential therapeutic interventions.

Equally important is the discovery of factors that predict prostate cancer aggressiveness. This is crucial because despite the ubiquitous nature of the disease, the clinical behavior of prostate cancer is widely heterogeneous. In fact, low grade, localized cancer that is left untreated often poses little risk to the patient in terms of symptoms or cancer death; the majority of these patients will ultimately die of other causes²⁹⁶. In fact, recent data from CaPSURE, a prostate cancer registry from 40 academic and community based practices across United-States reported that men diagnosed with very low risk prostate cancer have only a few percent risk of prostate cancer-specific mortality at 10 years, but have an almost 25% risk of all-cause mortality²⁸. In contrast, high grade advanced disease is frequently rapidly progressive and fatal. As an example, data from CaPSURE supports a more than 20% prostate cancer-specific mortality at 10 years for the most aggressive forms of prostate cancer. Despite advances in treatment strategies, prostate cancer remains the second most common cause of cancer-related mortality in the United States, surpassed only by lung cancer²⁹⁵.

Due to the adoption of widespread PSA screening in the United States in the early 1990's, there has been a significant stage migration, with the majority of tumors in the

modern era diagnosed at an early, clinically localized stage²⁹⁷. Although most of these tumors could be treated successfully, today's most popular treatment modalities – surgery and radiation therapy – are associated with substantial long-term side effects including erectile dysfunction and urinary incontinence²⁹⁸. Thus, the focus of clinical research in recent years has shifted towards identifying those patients with aggressive disease who are at risk for progression, metastases, and death and thus warrant definitive treatment despite the associated side effects. Similarly, a growing body of basic research and observational studies are focusing on identifying environmental and genetic factors that predispose to advanced disease.

The Role of Inflammation in Carcinogenesis

Chronic inflammation has been implicated as a causative factor in a wide range of malignancies, including lung, colorectal, pancreatic, bladder, and hepatocellular carcinomas⁷⁹. In fact, inflammation is thought to play a role in the causation of approximately 20% of all human cancers²⁹⁹. Increasing evidence supports the role of prostatic inflammation as a risk factor for both development and progression of prostate cancer. It is hypothesized that pro-inflammatory mediators within the prostate can lead to a state of chronic inflammation, resulting in lesions of proliferative inflammatory atrophy that may transition to prostatic intraepithelial neoplasia and eventually adenocarcinoma²⁹⁹. Several sources of inflammation may influence the risk of prostate cancer, including dietary⁸⁷, genitourinary bacterial^{59, 88} and viral⁸⁹ infections, and intraprostatic urine reflux^{91, 92}. With regard to diet, a number of nutritional factors may reduce the risk and progression of prostate cancer through anti-oxidant and anti-inflammatory effects⁸⁷. These include omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs), fish, selenium, vitamins D and E, and lycopene⁸⁷.

PUFAs are classified according to their molecular configuration: omega-6 (n-6) or omega-3 (n-3). The pro-inflammatory n-6 PUFAs, such as linoleic acid (LA) and arachidonic acid (AA), are metabolized through the cyclooxygenase (COX) pathway into

inflammatory eicosanoids, including prostaglandin E_2 —which has been linked to carcinogenesis in studies of prostate and other tumors^{300, 301}. In contrast, the anti-inflammatory n-3 PUFAs, such as α -linolenic acid (ALA) 18:3, eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5, docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 and docosapentaenoic acid (DPA) 22:5 exhibit their anti-inflammatory properties by competitively inhibiting the AA cascade, mainly at the cyclooxygenase (COX) pathway³⁰². This inhibition reduces the production of pro-inflammatory prostaglandins derived from arachidonic acid, potentially preventing their carcinogenic effect. The long chain n-3 PUFAs (LC n-3), EPA, DPA and DHA, appear to be the most potent inhibitors of the COX inflammatory pathway.

PUFAs appear to be beneficial in the prevention and treatment of numerous disease states, including cardiovascular disease, neurodegenerative disorders, and cancer³⁰³. The anti-neoplastic effect of PUFAs in-vitro has been demonstrated in breast, colon, lung, liver, pancreatic, and leukemia cell lines³⁰⁴. This beneficial effect may be mediated through the anti-inflammatory properties of PUFAs, or their modulation of cytokine production.

Foods rich in n-3 PUFAs include canola and linseed oil, as well as various fish including: herring, salmon, trout, tuna, and cod³⁰⁵. In the typical “Western diet”, the main sources of LC n-3 PUFAs are dark fish and shellfish. The actual LC n-3 content varies according to fish type; however these fatty fish are often recommended as an important component of a healthy diet. Epidemiologic studies investigating cancer risk in populations with increased intake of these PUFA-rich foods have been somewhat equivocal. Although some have replicated the promising results of the in-vitro studies, many have found no beneficial effect of PUFAs on the incidence of various malignancies³⁰⁶. Investigators have hypothesized that the lack of an anti-neoplastic effect of PUFAs in these studies may be due to an inability to accurately quantify PUFA intake from diet and the potential contamination of PUFA-rich foods with carcinogenic substances. Thus, as the laboratory and epidemiological data is often conflicting, further investigation is needed to clarify the effects of PUFAs on carcinogenesis and disease progression in various malignancies.

Experimental Support for PUFA / COX-2 Involvement in Prostate Cancer

Multiple lines of evidence suggest that polyunsaturated acids (PUFAs) play a role in prostate carcinogenesis. This effect appears to be at least partially mediated through the enzyme cyclooxygenase (COX). COX, also known as prostaglandin H synthase (PTGS) or prostaglandin-endoperoxide synthase, catalyzes the rate-limiting step in the formation of inflammatory prostaglandins. While the first form of the enzyme (COX-1) is involved in production of prostaglandins for cellular housekeeping functions, the second form (COX-2) is inducible and is associated with biologic events such as injury, inflammation, and proliferation. As stated above, n-3 and n-6 PUFAs are both substrates for COX, and directly compete for access to the enzyme. COX metabolism of n-6 PUFAs results in production of pro-inflammatory prostaglandins; however this metabolic pathway can be blocked by n-3 PUFAs.

COX-2 is overexpressed in prostate tumors, and thus is speculated to play a role in prostate carcinogenesis³⁰⁷. In a mouse model, inhibition of COX-2 suppressed cell growth and led to regression of existing tumors, potentially through induction of apoptosis or decreased tumor angiogenesis³⁰⁸. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have a well-known anti-inflammatory effect in humans, which is partially mediated by COX inhibition. Several epidemiological studies have preliminarily reported that regular NSAID use may in fact decrease the risk of developing prostate cancer in humans³⁰⁹⁻³¹¹. Experimental studies in humans have also shown that three months of a low-fat, fish oil supplemented diet decreased COX-2 expression in prostatic tissue in four of seven men with untreated prostate cancer³¹².

Numerous animal studies have demonstrated that adjusting the ratio of n-3 to n-6 PUFAs in the diet can alter the behavior of prostate tumors, an effect that appears to be partially mediated through COX-2. In studies of athymic mice with implanted prostate tumors, those mice fed an n-3 versus an n-6 PUFA diet exhibited a decreased expression of the inducible pro-inflammatory COX-2 enzyme in tumor cells, as well as decreased tumor cell proliferation and increased apoptosis³¹³. Furthermore, n-3 PUFA fed mice were found

to have a decreased rate of prostate cancer recurrence after surgical excision of their tumors (mimicking radical prostatectomy)^{313, 314}. It was hypothesized these effects were due to an increased relative concentration of n-3 PUFAs, leading to a greater degree of COX-2 inhibition. Studies of Pten-knockout mice, an immune-competent orthotopic prostate cancer model, showed that a diet rich in n-3 PUFAs reduces prostate cancer growth, decreases progression, and increases survival³¹⁵.

Additional animal studies found that mice fed an EPA-rich diet have higher LC n-3 content in implanted prostate tumors, as well as a better response to hormone ablation. This indicates that PUFAs may play a role in preventing progression of prostate cancer to the androgen-independent state, an end-stage of disease for which very few effective treatment options are available³¹⁶.

Although the mechanisms through which PUFAs may exert anti-neoplastic effects are not entirely clear, several hypotheses have been proposed^{304, 317} (Figure 1). Competitive inhibition of the COX and lipoxygenase enzymes by n-3 PUFAs leads to decreased production of several inflammatory and potentially carcinogenic molecules, including prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. Additionally, n-3 PUFAs may modulate the activity of cyclins and cyclin dependent protein kinases in tumor cells, thus shifting the balance away from cell division and towards apoptosis. Finally, n-3 PUFAs have been shown to alter the expression of nuclear factor-kappaB (NF-κB), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and retinoid X receptors (RXR), and other transcription factors in-vitro³¹⁸. These cellular agents have been implicated in prostate-cancer carcinogenesis, and may represent an alternative pathway through which n-3 PUFAs exhibit anti-neoplastic activity.

Epidemiological Findings:

PUFAs and Risk of Prostate Cancer

Epidemiological studies investigating associations between fish/PUFA intake and the development of prostate cancer have given equivocal findings. Of 26 cohort and case-

control studies investigating fish/PUFA intake and incidence of prostate cancer, 11 reported inverse association³¹⁹⁻³²⁹, seven positive associations³³⁰⁻³³⁶, and eight showed no association³³⁷⁻³⁴⁴. If one looks only at the 15 cohort studies, again the results are widely conflicting, with six studies suggesting a protective effect of fish/PUFAs³¹⁹⁻³²⁴, three reporting a harmful effect³³⁰⁻³³², and six showing no association³³⁷⁻³⁴².

Overall fish intake, but not the intake of individual PUFAs, has been most consistently inversely associated with prostate carcinogenesis. Although several studies showed no correlation^{323, 337, 338, 340}, at least six studies reported either a trend or a definite association between fish intake and a decreased risk of prostate cancer^{319, 320, 325-327, 329}. Terry et al.³²⁰ studied a population of 6,272 Swedish men who were followed prospectively for the development of prostate cancer, and found that those men who ate no fish had a two to three-fold increased risk of cancer compared to those who ate moderate or high amounts of fish. Two case-control studies reported on separate populations of Canadian men, and both found a statistically significant inverse association between fish intake and the incidence of prostate cancer^{325, 326}, as did Hedelin et al.³²⁹ in a Swedish study. Collectively, these data support a protective effect of fish, which could potentially be mediated through n-3 fatty acids, probably more specifically through LC n-3.

Interestingly, however, most studies specifically investigating the overall effects of n-3 PUFA intake have shown no correlation with prostate cancer risk. Park et al. reported on a large prospective cohort of 82,483 men in the United States and found a trend towards a decreased risk of prostate cancer with n-3 PUFA intake, although this effect was largely limited to Latino and white men³²³. Two smaller cohort studies however found no association between n-3 PUFA intake and prostate cancer^{337, 342}.

Several authors have reported on associations between individual n-3 PUFAs (ALA, DHA, EPA) and prostate cancer, and again reached largely equivocal results^{321, 323, 324, 328, 332, 336, 339, 342-344}. Although a number of studies reported a negative association between ALA intake and prostate cancer^{321, 323, 328}, both Giovannucci et al.³³² and Ramon et al.³³⁶ actually found an increased risk of disease with increasing ALA intake. ALA content is

quite high in both red meat and animal fat, which have been implicated as causative factors for prostate cancer³⁴⁵, possibly due to increasing the production of free radicals³³¹. Although one relatively large cohort study reported a negative association between DHA/EPA intake and prostate cancer³²⁴, multiple other studies found no association^{321, 323, 342, 344}.

Finally, most studies found no association between n-6 PUFA intake and prostate cancer^{322, 323, 336, 342}. However there is a suggestion of decreased risk of disease with increasing intake of LA, the most prevalent n-6 PUFA. Two cohort studies from the Netherlands³²¹ and Finland³²² reported a non-significant trend towards a decreased risk with LA intake, whereas an Italian case-control study found statistically significant inverse associations³²⁸. This effect may be mediated through the preferential intake of foods rich in LA over those high in saturated fats, as occurs with the substitution of margarine for butter.

PUFAs and Risk of Advanced Prostate Cancer

Whereas the literature reports widely variable effects of fish/PUFA-intake on prostate cancer incidence, there is stronger data supporting the ability of these foods to decrease the risk of advanced stage disease, metastases, and death. Augustsson et al. reported on a large prospective cohort from the U.S. Health Professionals Follow-Up Study and found that men who ate fish more than three times per week were approximately half as likely to develop metastatic cancer as those who ate fish less than twice per month³¹⁹. Three additional cohort studies reported significantly reduced rates of prostate cancer-specific mortality in those men consuming larger quantities of fish^{320, 337, 346}.

Identification of the actual nutritional components of fish that are responsible for this decrease in advanced-stage disease and mortality, however, is complicated. Prior reports have hypothesized that n-3 PUFAs are the protective factor, but there is only modest data in the literature to support this claim. Whereas several studies have shown at least a trend towards decreased risk of advanced disease or death with n-3 PUFA intake^{323, 337}, most studies investigating individual n-3 PUFAs (ALA, EPA, DHA) have not

replicated this finding^{321, 323, 339, 342-344, 347}. Of five reports investigating the effects of EPA and DHA on advanced disease, only one cohort study reported an inverse association³²⁴, whereas the remainder found no association^{321, 323, 342, 344}. Contrary to many hypotheses, increasing ALA intake has actually been shown to increase the risk of advanced-stage disease in several studies. Two separate prospective analyses of the U.S. Health Professionals Follow-Up Study first reported increased rates of advanced disease³²⁴, and then death³³², with increasing ALA intake. A separate case-control study of patients with extra-prostatic or metastatic cancer in Uruguay found a positive association between ALA and these adverse outcomes³⁴⁸.

In our own research, we found strong inverse associations between increasing intake of long-chain omega-3 PUFAs (LC n-3) EPA, DPA and DHA and aggressive prostate cancer³⁴⁹. The decreased risk followed a clear dose-response pattern across increasing levels of LC n-3 intake, whereby men in the highest quartile of consumption had less than half the risk of aggressive disease in comparison to men in the lowest quartile. Similar inverse associations were observed for increasing intake of dark fish and shellfish, the two main sources of LC n-3.

Discussion of Epidemiological Studies

The above discussion illustrates the significant controversy in the literature regarding the effects of fish/PUFA intake on the incidence of prostate cancer and the progression to advanced-stage disease. The explanation for the markedly heterogeneous results remains unclear, but a careful examination of the methods underlying the published studies provides important insights.

In many of the studies reporting no association between PUFAs and prostate cancer incidence, the fish type was not differentiated^{323, 340} or individual PUFAs were not distinguished, but rather evaluated overall^{321, 341, 350}. Supported primarily by a trend from the more recent literature, LC n-3—and fish rich in these nutrients—appear protective, while other n-3 PUFAs or n-6 PUFAs may be deleterious for prostate cancer. All PUFAs,

and even all n-3 PUFAs may not be equal regarding their effect on prostate cancer, and it appears important to study the nutrient's effect separately.

Additionally, in many studies the exposure was defined with a single survey, with follow-up twenty to thirty years later, during which time dietary patterns may have changed significantly. For example, in Japan there is evidence that dietary habits changed significantly over the past decades,³⁵¹ during which time one study showing a positive association between fish intake and prostate cancer was conducted.³³⁰

These potential measurement issues may explain the absence of association sometimes observed. Prospective studies where exposure is reassessed periodically, such as the Health Professional Follow-up Study^{319, 324}, provide better measures of adult dietary intake and changing dietary factors, and have shown a protective effect of fish intake on prostate cancer incidence. Moreover, some negative studies were conducted on cohorts with short follow-up, which might be problematic for prostate cancer since it is a relatively latent disease generally occurring later in life^{331, 332}.

The level of n-3/fish intake may affect study results. A very low level of dietary n-3/fish may make it difficult to detect associations due to the narrow range of exposure variation. In fact, some studies observing no association were conducted in populations where n-3/fish levels were substantially lower^{321, 323, 340} than in studies where significant inverse associations were observed, such as the Health Professionals Follow-Up Study³¹⁹. Of the studies reporting a positive association between LC n-3/fish intake and prostate cancer risk, two were undertaken in populations with much higher fish intake than our study—Sweden³⁴² and Japan³³⁰—and they did not differentiate type of fish consumed. Although some have proposed the effect of LC n-3 PUFAs may convert from protective to harmful when consumed in excessive quantities, there is no data to support this hypothesis, not even from studies of cardiovascular diseases, where modeling of effect by level of intake has been proposed³⁵².

Another possible explanation is that the positive association could be attributed to environmental toxins, such as polychlorinated biphenyls (PCBs) or methylmercury

compounds contained in fish. These toxins are known to disrupt the androgen/estrogen balance, and exposure has been linked to the risk of prostate cancer in prior reports^{353, 354}. Certainly, further investigation is needed to clarify this potentially harmful interaction.

The literature suggests that fish/LC n-3 may have a more pronounced effect on biologically aggressive tumors or on their progression, and less on carcinogenesis of more benign or earlier stage tumors often detected by screening. This appears to be true across several different geographic areas with significantly varying baseline population levels of fish and LC n-3 intake^{319-321, 324, 330, 340, 342}. The beneficial effect requires further investigation, as clarification and exploitation of this pathway could potentially decrease rates of progression, metastases, and death in men with early-stage low-grade disease.

Finally, the somewhat inconsistent findings in the literature might reflect the distinct heterogeneity of prostate cancer. The potential protective effect of fish and LC n-3 appears strongest for aggressive disease, which may exhibit different biological behavior than low-stage, low-grade disease. Even within individual studies, disease heterogeneity could potentially mask a beneficial effect of PUFAs. Those studies investigating prostate cancer incidence often included patients with a wide range of disease, from clinically localized tumors detected through screening, to those patients presenting with extraprostatic or metastatic disease. Thus, the beneficial effects of PUFAs on one stage of disease could potentially be masked by their lack of effect on another. Additionally, tumors are now often detected through PSA screening, whereas earlier studies were conducted prior to the PSA era, or in countries where PSA screening is not routinely practiced. Given the stage migration that has resulted from widespread PSA screening²⁹⁷, one would expect a larger percentage of early-stage, low-grade tumors in the most recent studies. Since it appears that the protective effect of PUFAs is greater for advanced stage tumors, stage migration towards early-stage disease may bias study results towards finding no associations between PUFAs and incidence of disease, further contributing to the widely conflicting conclusions in the published literature.

Modification by COX-2 Genotype

Candidate gene studies have found that sequence variants in the COX-2 gene influence the risk of prostate cancer¹¹²⁻¹¹⁴. Thus, effect modification by COX-2 genotype was hypothesized as a possible explanation for the wide variation in reported associations between n-3 PUFA intake and prostate cancer. A recent study of Swedish men confirmed this interaction, finding that frequent consumption of fatty fish—a proxy for long-chain n-3 PUFAs—was inversely associated with prostate cancer risk (OR= 0.57; 95% CI: 0.43-0.76)³²⁹. Moreover, this effect was modified by the rs5275 (+6364 A>G) single nucleotide polymorphism (SNP) in COX-2, whereby only men carrying the variant allele maintained a strong inverse association between fatty fish intake and prostate cancer. This suggests that the potential protective effect of long-chain PUFAs on prostate cancer may be modified by COX-2.

In our research, we found that the LC n-3 inverse association was stronger in carriers of the variant COX-2 SNP rs4648310 (+8897 A>G)³⁴⁹. Interestingly, men with the variant genotype (AG or GG) and low intake of LC n-3 had a much higher risk of aggressive disease than men with the variant genotype but a high intake of LC n-3. This suggests that while carriers of the variant SNP had an overall increased risk of aggressive prostate cancer, this deleterious effect was found only in men consuming low levels of LC n-3, and the association could be reversed by increasing consumption of LC n-3. This interaction was similar across individual LC n-3 (EPA, DPA and DHA) and dark fish (interaction $p = 0.002$, data not shown)—the main source of the PUFAs.

These results are in general agreement with those previously reported in the Swedish study³²⁹. Although rs4648310 (+8897 A>G) was not genotyped in their study, they found that another COX-2 SNP (rs5275, +6364 A>G) modified the impact of fish intake on prostate cancer (p interaction < 0.01). In particular, Salmon-type fish consumption—a proxy for LC n-3 intake—was protective only among men carrying the variant rs5275 genotypes (p trend < 0.01). We did not observe a similar pattern of

interaction with rs5275 in our study (p interaction = 0.8). SNPs rs4648310 and rs5275 are not in linkage disequilibrium in our population ($r^2=0.01$, among whites).

The functional impact of rs5275, an intronic variant, and rs4648310, flanking the 3' COX-2 gene, on COX-2 activity is not yet known. It is possible that either of these polymorphisms, or another linked variant, may affect function of the COX-2 enzyme. Just as the protective effect of n-3 PUFAs may be mediated through the COX-2 SNP rs4648310, we have previously shown that variation at a separate COX-2 SNP rs2745557 alters the ability of NSAID to affect risk of disease¹¹⁴. Both LC n-3 and NSAID compete with arachidonic acid for binding to the COX active site, although their downstream effect appear different^{355, 356}. Thus, it could be hypothesized that variation at these COX-2 SNPs alters the enzyme's structure or function, enabling it to preferentially bind LC n-3, NSAID, or other substrates. This changing affinity for various ligands may affect the enzyme's pro-inflammatory function, and thus modify the risk of developing prostate cancer. Collectively, the combined findings of our study³⁴⁹ and that of the Swedish population³²⁹ support the overall hypothesis that LC n-3 modifies prostate inflammation through the COX-2 enzymatic pathway.

Summary

Despite conflicting results in the literature, recent data presents convincing evidence that dietary long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3), are inversely associated with aggressive prostate cancer. This potential protective effect may be modified by genetic variation in COX-2. Interestingly, it appears the deleterious effect of one SNP (rs4648310, +8897 A>G) can be reversed by increased LC n-3 intake. These results support the role of inflammation and COX activity in prostate cancer susceptibility and progression. More clinical and biological studies are needed to decipher the mechanisms through which dietary long-chain omega-3 fatty acids and other factors involved with inflammation such as COX-2 genotypes may affect prostate cancer risk and aggressiveness.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Institute of Health grants (CA88164, CA94211).

VF was supported by the McLaughlin dean's grant from Laval University.

1.4. L'effet des statines sur le cancer

1.4.1. La découverte des statines

Les agents visant à réduire le taux de cholestérol sérique sont utilisés pour les maladies cardiovasculaires depuis la deuxième moitié du XXe siècle. L'enzyme hépatique limitante dans la production du cholestérol sérique, la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A-réductase (HMG-CoA-réductase), a été identifiée pour la première fois au début des années 1970 par Endo et son équipe^{357, 358}. Ils ont identifié une molécule inhibitrice de l'HMG-CoA-réductase, la mevastatine, faisant partie de la classe médicamenteuse maintenant communément appelée : statines. Vers la fin des années 1980, les statines étaient reconnues pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Dans les années 1990, de nombreuses études ont démontré l'indication des statines dans la prévention secondaire³⁵⁹⁻³⁶¹ et primaire³⁶²⁻³⁶⁴ des maladies cardiovasculaires. Le profil de sécurité favorable des statines est bien établi. Celles-ci représentent la classe médicamenteuse associée aux ventes les plus élevées, atteignant 12,5 milliards de dollars annuellement aux Etats-Unis en 2004, alors que seulement environ un tiers des personnes ayant l'indication d'une statine en prenait réellement³⁶⁵. On commence maintenant à identifier de probables nouveaux effets des statines dans des domaines aussi variés que la démence³⁶⁶⁻³⁶⁸, la sclérose en plaques³⁶⁹⁻³⁷¹, l'arthrite rhumatoïde^{372, 373} et les fractures³⁷⁴⁻³⁷⁷.

1.4.2. Effet préventif des statines contre le cancer

1.4.2.1. Effet préventif sur le risque de développement du cancer

Sur le plan épidémiologique, une littérature de plus en plus abondante tend à démontrer un potentiel de chimioprévention des statines contre le cancer. La suggestion de cette action a initialement été démontrée par l'équipe du laboratoire du Dr LeLorier^{378, 379}, puis confirmée dans de nombreuses autres études, dont plusieurs méta-analyses³⁸⁰⁻³⁸². Une controverse persiste toutefois quant à la certitude de ce rôle puisqu'une méta analyse a

mesuré une absence d'effet protecteur³⁸³. L'effet chimiopréventif serait vrai pour plusieurs sites de cancer, particulièrement pour le cancer de la prostate. Une diminution de l'incidence du cancer de la prostate pourrait donc être associée à la prise de statines. Dans un contexte de patients référés à une clinique d'urologie pour biopsie prostatique, un autre groupe a aussi démontré une diminution de l'incidence chez les patients prenant des statines comparativement à ceux qui n'en prenaient pas³⁸⁴.

1.4.2.2. Effet anti-cancer après traitement initial du cancer

Les statines semblent aussi avoir un impact protecteur sur la récurrence après traitement. Le groupe du Memorial Sloan Kettering Cancer Center a démontré une diminution de la récurrence biochimique du cancer de la prostate chez les patients prenant des statines au moment du traitement par radiothérapie³⁸⁵. Une tendance, toutefois non statistiquement significative, a été observée entre la prise de statines et une diminution de la récurrence biochimique chez les patients traités par brachythérapie dans une cohorte avec un suivi médian de 5.3 années, soit relativement court³⁸⁶.

1.4.3. Effet des statines sur le cancer de la vessie

La seule étude clinique publiée évaluant l'impact de statines sur le cancer de la vessie vient de Boston³⁸⁷. Le contexte de cette étude était un protocole de préservation vésicale, dont le traitement était composé de chimiothérapie combinée à la radiothérapie, et dont le but était d'éviter la cystectomie radicale pour le traitement de tumeurs envahissant le muscle de la vessie. Les patients qui prenaient des statines au moment du protocole de traitement avaient un meilleur succès de leur traitement. Les statines semblent donc avoir aussi un effet protecteur sur le cancer de la vessie infiltrant.

1.4.4. Mécanisme d'action des statines

1.4.4.1. Synthèse du cholestérol et cascade de l'acide mévalonique

Le mécanisme d'action biologique anti-cancer des statines est de plus en plus étudié³⁸⁸. Le principal mécanisme d'action reconnu aux statines est l'inhibition de l'enzyme HMG CoA réductase, enzyme limitante dans la synthèse de l'acide mévalonique, l'acide gras intermédiaire dans la synthèse du cholestérol. Mais des mécanismes indépendants de la voie de l'acide mévalonique sont aussi décrits. Les statines peuvent se lier directement au lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA1), qui a un rôle important dans la migration des lymphocytes et l'activation des cellules T³⁸⁹. Les effets bénéfiques des statines dans les maladies cardiovasculaires ont été liés à des effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs sur l'adhésion cellulaire³⁹⁰. L'angiogénèse, capacité tissulaire cruciale pour le développement d'une tumeur cancéreuse, est inhibée par les statines^{391, 392}. Le rôle des statines a aussi été étudié dans des modèles cellulaires et animaux, pour plusieurs types de cancers. Pour le cancer de la prostate, la diminution du cholestérol membranaire associé au simvastatin induit l'apoptose des cellules LNCaP en culture via l'inhibition de la kinase Akt³⁹³. Les mécanismes pleiotropiques des statines pourraient bien expliquer leur action dans de nombreuses maladies chroniques.

1.4.4.2. Effet immuno-modulateur des statines

Les statines pourraient aussi avoir un effet immuno-modulateur dans le cancer de la vessie. Ceci a été suggéré par Hoffmann et collègues de Belgique³⁹⁴, avec leur série de 84 patients atteints de tumeurs vésicales superficielles traitées par immunothérapie non-spécifique avec du bacille Calmette-Guérin (BCG) intra-vésical. Les patients qui prenaient des statines au moment du traitement avaient un plus haut taux d'échec que les patients qui n'en prenaient pas. Le ratio de cotes est de 4.9 (IC 95% = 1.64 – 14.69) pour la progression, défini comme une aggravation de l'agressivité tumorale à l'analyse pathologique, et de 4.5 (IC 95% = 1.43 – 14.30) pour la cystectomie. Ceci est noté malgré le fait que le suivi est légèrement plus court dans le groupe prenant des statines (37 mois vs 50 mois, p=0.20). Le

principal facteur de confusion potentiel est l'âge au diagnostic qui est plus élevé dans le groupe prenant des statines (médiane de 70 ans vs 63 ans, $p=0.44$), mais il n'a pas un gros poids statistique et les auteurs mentionnent sans trop de clarté qu'ils ont ajusté pour cette variable. Comme la réponse immunitaire est reconnue moins prononcée chez les gens plus âgés, il est possible que la réponse plus faible au BCG ne soit simplement due qu'à ce facteur. L'hypothèse de ce groupe est que les statines, par leurs effets immuno-modulateurs, bloquent la réponse anti-tumorale causée par le BCG.

Le groupe M.D. Anderson Cancer Center, mené par Kamat ³⁹⁵, a toutefois démontré dans leur série de 156 patients une absence d'effet de l'exposition aux statines sur la réponse au BCG. Par contre, comme l'effet mesuré est nul, il y a un risque d'erreur de classification de l'exposition aux statines dans leur banque de données, et comme l'exposition est présentée de façon dichotomique dans leur étude, si la fréquence d'erreur de classification est élevée, ceci pourrait faussement faire tendre l'association vers un effet nul.

1.4.4.3. Effet anti-cancer serait fonction du sous-type de statine

Les statines peuvent être classées en fonction de leur lipophilicité ³⁹⁶. Les pro-drogues lactones, soient la lovastatine et la simvastatine, sont les plus lipophiles. Pour que certains mécanismes anti-cancer s'exercent, la molécule doit pénétrer les membranes cellulaire et nucléaire. Les molécules hydrophiles auront tendance à moins pénétrer la cellule, de par leur incapacité à diffuser librement au travers des membranes cellulaires. Par contre, certaines statines, comme la pravastatine, entrent dans la cellule par des transporteurs membranaires. Il est suggéré que la lipophilicité soit une caractéristique cruciale à l'activité anti-cancer des statines. Notre visée est d'évaluer l'effet des différentes classes de statines sur la progression du cancer de la vessie.

1.5. Comparaison des types de devis d'étude épidémiologique

Une étude épidémiologique débute avec une question. Ensuite, le chercheur choisira le devis d'étude le plus approprié aux circonstances et surtout à la question de l'étude. Le devis de l'étude est le plan pour la sélection des sujets d'étude et pour l'obtention des données à leurs propos. Les sujets d'étude en épidémiologie sont typiquement des individus mais à l'occasion peuvent être d'autres types d'unités d'observation comme des groupes sociaux, des lieux, des périodes de temps ou même des articles publiés comme dans les méta-analyses. L'information à-propos des sujets d'étude peut provenir de sources préexistantes ou peut-être assemblée de diverses méthodes incluant l'observation directe, les entrevues, des examens ou des mesures physiologiques.

Une manière pratique de classer les types de devis d'étude est fonction de la présence ou de l'absence d'une hypothèse spécifique initiale. Les études descriptives sont conduites sans une hypothèse spécifique initiale. Elles sont typiquement les études les plus précoces au sujet d'une nouvelle maladie et servent à caractériser cette nouvelle condition, sa fréquence et sa relation avec le temps, l'espace et le type d'individu.

Le rapport de cas est le plus simple exemple d'une étude descriptive où on rapporte un événement clinique d'intérêt souvent rare. On peut décrire aussi un traitement nouveau. Les séries de cas démontrent que les événements rares ou d'intérêt peuvent se reproduire répétitivement. Elles servent à décrire la variabilité de ces conditions. Enfin, les études descriptives peuvent être basées sur des taux dans lesquelles on combine des données portant sur un échantillon d'une population combiné avec des mesures populationnelles qui préciseront le dénominateur. Elles servent à quantifier la charge ou le fardeau d'une maladie sur la population en utilisant les mesures typiques de l'épidémiologie.

Les études analytiques sont conduites pour tester une ou plusieurs hypothèses spécifiques, normalement pour déterminer si une exposition particulière influence le risque d'une maladie.

Les études analytiques peuvent être expérimentales ou non-expérimentales. L'expérience est l'emblème de la science. C'est en effet le devis d'étude qui a la plus grande validité interne et qui permet typiquement de tirer des conclusions solides. Ceci est parce que l'expérience est faite en condition contrôlée. L'expérience vise à démontrer quel effet a la manipulation des conditions sur des observations mesurables. Certains élargissent même la définition d'une expérience à des observations bien contrôlées sans que les conditions soient nécessairement manipulées par l'expérimentateur. Par exemple, l'étude des observations astronomiques durant l'éclipse solaire de 1919 qui ont corroborées la théorie de la relativité générale d'Einstein est souvent considérée comme une "expérience".

En général, on restreint normalement la définition d'une expérience à la situation lorsque l'investigateur manipule les conditions. Comme l'épidémiologie porte sur les sujets humains, les expériences sont donc limitées à des expositions ne causant pas de tort chez l'humain. Le principe de l'expérience est de maximiser la validité interne de l'étude. Pour cette raison, l'allocation de l'intervention doit se faire selon le protocole d'étude, non pas selon le besoin du patient. Par contre, le principe éthique fondamental aux expériences épidémiologiques veut que l'expérience porte seulement sur des interventions qui ont un effet préventif sur la maladie ou son évolution. La déclaration d'Helsinki détaille tous les principes éthiques nécessaires à la conduite d'expériences épidémiologiques et déborde le présent sujet. Elle discute, entre autres, du principe de l'*équipoise*, qui veut que toutes les options d'intervention d'une étude expérimentale chez l'humain correspondent à des traitements acceptables devant l'état des connaissances actuelles. Ceci limite, par exemple, l'utilisation d'un placebo si des interventions bénéfiques sont connues pour la condition à l'étude.

Les devis non-expérimentaux ne requièrent pas un processus de randomisation typiquement utilisé pour l'allocation des interventions dans les études expérimentales. Puisque l'exposition s'est déjà produite 'naturellement', ceci peut donner l'opportunité d'étudier des expositions potentiellement délétères pour l'humain, ce que l'essai clinique ne permet pas. Par contre, le chercheur doit assumer que l'exposition d'intérêt n'est pas

distribuée au hasard dans la population. Inévitablement, des différences systématiques entre les personnes exposées et non exposées existent et vont déformer la relation entre l'exposition et l'issue étudiée. Ceci est la source des points d'intérêt méthodologiques essentiels à ce type d'étude : le biais et la confusion, qui seront discutés au chapitre suivant (1.6.).

1.6. Les sources d'erreur en épidémiologie

L'erreur dans la mesure est inhérente à toute mesure. En épidémiologie, les mesures sont de plusieurs ordres : les mesures de fréquence de la maladie, incluant le risque, le taux d'incidence et la prévalence ; les mesures de faits, incluant les différences et les ratios de risques ou de taux d'incidence ; et les fractions attribuables. L'objectif de toute étude est de bien mesurer un phénomène réel. En ce sens, Rothman écrivait³⁹⁷ élégamment:

"Epidemiologic studies made the viewed as measurement exercises undertaken to obtain estimates of these epidemiologic measures".

Deux grandes catégories d'erreurs affligent les études épidémiologiques : l'erreur aléatoire et l'erreur systématique. Au moment de la conception d'une étude, un épidémiologiste tente de réduire les deux sources d'erreur. Dans l'interprétation d'une étude, le lecteur doit être informé des deux types d'erreur et comment ils ont été pris en charge.

Peu importe le sujet d'une étude, malheureusement, on ne peut jamais savoir quelle est la valeur correcte de la valeur de la mesure qui est estimée par l'étude. Tout ce qu'on ne pourra jamais savoir est la valeur de l'estimation d'une étude ou plutôt, la valeur des estimés de plusieurs études. D'où l'importance de la multiplicité des études afin d'augmenter la précision globale de l'estimation de la mesure d'un concept. Parce que ces valeurs exactes sont inconnues, nous ne pouvons pas déterminer la réelle quantité d'erreurs dans quelque étude que ce soit. Il y a une zone grise dans notre capacité d'être précis que

nous devons accepter. Toutefois, les épidémiologistes peuvent tenter de réduire les sources d'erreurs en utilisant des méthodes adéquates au moment de la conception d'étude ainsi que de son analyse. Qui plus est, en tant que lecteur, nous devons examiner la conception et l'analyse d'une étude qui peut soit contribuer ou prévenir les erreurs.

Nous discuterons d'abord des erreurs aléatoires et du rôle des statistiques, puis des erreurs systématiques, communément appelées les biais.

1.6.1. L'erreur aléatoire et le rôle des statistiques

Les statistiques jouent deux rôles principaux dans l'analyse des données épidémiologiques : le premier est d'estimer la variabilité dans les données, ceci permettant de différencier les trouvailles fortuites de trouvailles qui ont le plus de chance de se répliquer advenant la répétition d'un même travail; l'autre rôle de mieux estimer l'effet de la mesure d'intérêt en corrigeant des biais comme la confusion. L'objectif du présent chapitre n'est clairement pas de réviser tous les fondements et principes mathématiques qui sous-tendent la biostatistique. Toutefois, inspirés de Rothman³⁹⁷ puisque c'est celui qui nous semble avoir le plus insisté sur les concepts définissant le niveau de certitudes des mesures épidémiologiques, nous allons approfondir certains concepts cruciaux épidémiologiques qui sont directement dérivés de la statistique.

1.6.1.1. La folie de la 'signification statistique'

Si une étude épidémiologique est perçue comme un exercice de mesure, alors les résultats devraient être un estimé d'une quantité épidémiologique. L'épidémiologiste devrait donc quantifier à la fois l'ampleur de la quantité épidémiologique et exprimer le degré de précision avec lequel elle est mesurée. L'estimation donne justement ces deux quantités. Par exemple, la résultante d'une étude cas-témoins est de présenter une estimation claire du ratio de taux d'incidence pour une exposition. Lorsque l'estimation est présentée comme une valeur unique, on considère cette valeur comme un estimateur (*point estimate*). Ce ratio de taux d'incidence exprime la force ou la magnitude de la relation entre l'exposition et l'issue. Pour indiquer le niveau de précision de cet estimateur, on utilise un

intervalle de confiance (*confidence interval*), qui est un éventail de valeurs autour de l'estimateur. Un intervalle de confiance large indique une faible précision, tandis qu'un intervalle de confiance étroit indique une haute précision.

La raison d'être des intervalles de confiance est d'exprimer la variation statistique ou l'erreur aléatoire qui sous-tend l'estimateur. Évidemment, l'estimateur étant une valeur unique ne peut pas exprimer cette variation statistique. L'intervalle de confiance est exprimé en fonction d'un seuil de confiance choisi arbitrairement. Les niveaux communément choisis varient de 80 à 95%, quoique tout niveau variant de 0% à 100% soit possible. On interprète l'intervalle de confiance de la manière suivante : si le niveau de confiance est fixé à 95%, cela veut dire que si la collecte de données et l'analyse étaient reproduites de nombreuses fois, l'estimateur de l'étude répliquée serait inclus dans les limites de l'intervalle de confiance dans 95% du temps.

Cette définition implique que seulement le hasard ou la chance, serait l'élément qui changerait d'une étude répliquée à l'autre. Une autre prémisse est que la variabilité des données peut être décrite adéquatement par un modèle statistique et surtout, que les biais et confusions sont non existants. Ces conditions irréalistes ne sont typiquement même pas rencontrées dans des essais randomisés contrôlés. Dans les études épidémiologiques non expérimentales, une définition stricte et formelle telle que mentionnée plus haut de l'intervalle de confiance relève presque de la fiction et, selon Rothman, (Rothman Oxford University Press 2002) ne donne qu'une estimation grossière de la variabilité statistique d'un ensemble de données. Il serait préférable de ne pas considérer l'intervalle de confiance comme une mesure absolue de la variabilité statistique mais plutôt comme un guide général de la quantité d'erreur (toutes sources, variabilité statistique incluse) contenue dans les données. Eu égard à ces aspects, l'intervalle de confiance peut tout de même être considéré comme un bon descripteur de la précision de la mesure d'association, et certainement plus complet que l'autre paramètre, la valeur p décrit ci-après.

Les mêmes équations mathématiques génèrent aussi une autre mesure statistique communément rapportée soit la valeur p. Celle-ci est calculée en relation d'une hypothèse

spécifique, le plus fréquemment l'hypothèse nulle, qui établit qu'il n'y a pas de relation entre l'exposition et la maladie. La valeur p est conceptuellement basée sur la prémisse que l'hypothèse nulle est vraie. Cette mesure représente la probabilité que les données d'une autre étude répliquée démontrerait une association égale ou plus divergente de l'hypothèse nulle que celle observée dans la présente étude.

De manière similaire à l'intervalle de confiance, cette interprétation doit être prise avec un grain de sel pour de nombreuses raisons. La variabilité des données collectées a peu de chance de se conformer précisément à quelques modèles statistiques qu'ils soient. Par exemple, la plupart des modèles statistiques assument que les observations sont indépendantes les unes des autres, ce qui n'est fréquemment pas le cas dans nombre d'études épidémiologiques. Qui plus est, les données peuvent être influencées par des erreurs systématiques (biais) qui peuvent augmenter la variation au-delà de ce qu'un simple modèle statistique peut le quantifier. Ainsi, parce que les prémisses théoriques ne sont que rarement rencontrées, une valeur p ne peut généralement pas être prise pour une probabilité pleine de sens. A contrario, elle peut être perçue comme quelque chose de moins technique : une mesure de ressemblance relative entre l'hypothèse nulle et l'ensemble de données de l'étude. Aucune valeur p ne nous dicte si l'hypothèse nulle est correcte ou non. Le fameux seuil, arbitrairement défini, du $p < 0.05$ comme critère de rejet de l'hypothèse nulle ne devrait surtout pas être considéré comme un absolu, alors que c'est souvent le cas (voir section suivante 1.6.1.2). Ultimement, le jugement à-propos de l'exactitude de l'hypothèse nulle dépend de l'existence d'autres données et de la plausibilité de l'hypothèse nulle et de ses alternatives.

1.6.1.2. L'estimation épidémiologique

Le processus du test de l'hypothèse statistique décrit le processus décisionnel menant au rejet ou non d'une hypothèse particulière, fréquemment l'hypothèse nulle. Ce processus est basé sur la signification statistique déterminée par la valeur p . Lorsque celle-ci est plus petite que le seuil de signification prédéterminée, on rejette alors l'hypothèse nulle comme fausse. Si un résultat n'est pas jugé statistiquement significatif, alors

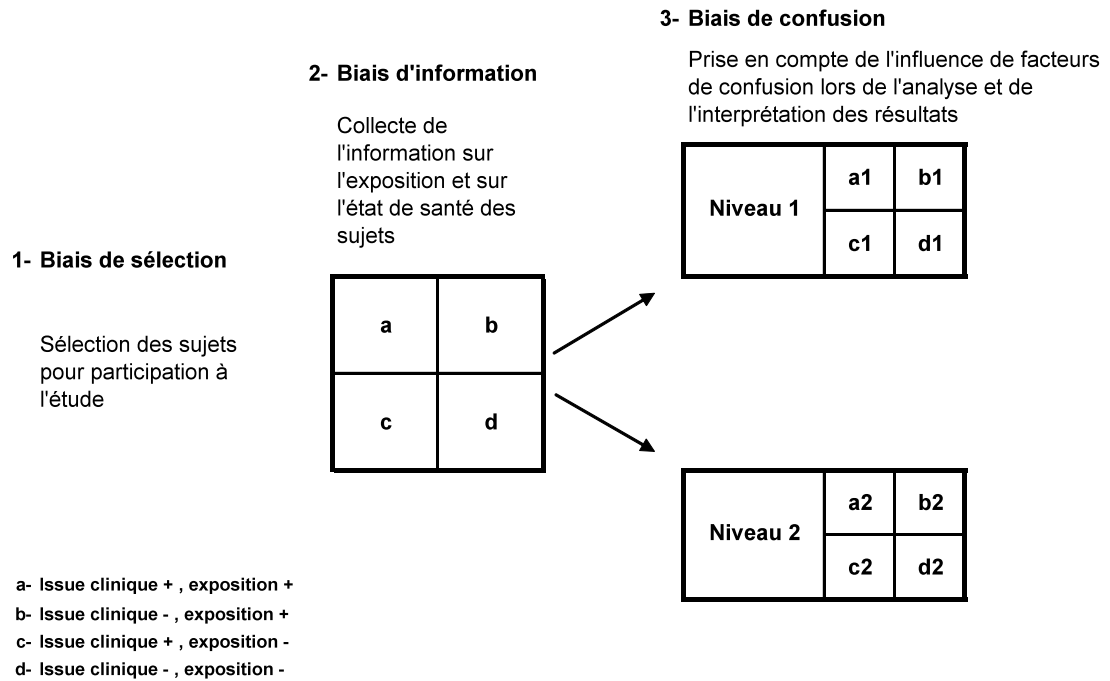
l'hypothèse nulle est acceptée. Ce mode de pensée grossier simplifie à outrance le processus de raisonnement. Il n'y a aucune analyse statistique qui puisse déterminer définitivement si une hypothèse nulle ou toute autre hypothèse est vraie ou fausse. Toutefois, la signification statistique est malheureusement trop souvent interprétée dans le sens que l'hypothèse nulle est soit vraie ou fausse. En pratique on retrouve trop souvent un test statistique accompagné par une déclaration de significatif ou non significatif ce qui renforce le message décisionnel que l'hypothèse nulle est soit vraie soit fausse. Cette déclaration de signification statistique dichotomique évacue déjà une partie importante de l'information contenue dans la valeur p . Il n'y a aucune raison que la valeur p numérique soit dégradée dans cette dichotomie encore moins informative. Qui plus est, même la valeur p quantitative a un problème : elle confond deux aspects importants de la donnée. Ces aspects sont la force ou l'ampleur de la relation entre l'exposition et la maladie, et la précision avec laquelle cette relation est mesurée.

Rothman donne un autre bel exemple pour illustrer comment le processus de chance contient de multiples aspects. On considère souvent que le tir à pile ou face d'une pièce de monnaie est un événement complètement imprédictible. Toutefois, ce tir à pile ou face peut être prédit avec suffisamment d'information à propos des conditions initiales du lancer de la pièce. D'ailleurs, certains individus ont tellement pratiqué ce geste qu'ils peuvent en prédire le résultat avec grande précision. Donc pour la majorité, le tir à pile ou face nous apparaît aléatoire alors que ce processus ne l'est pas nécessairement et peut dépendre de la pratique. D'une manière parallèle, plus notre connaissance des sources d'erreurs dans un ensemble de données particulier augmente, plus il est possible de réduire ce qui apparaissait initialement comme étant l'erreur aléatoire. Les physiciens expriment que nous ne serons jamais capables d'expliquer toutes les composantes de l'erreur, compte tenu que les sources d'erreur qui les intéressent sont quasi infinies. Toutefois, quant aux problèmes qui intéressent les épidémiologistes, il est raisonnable de penser qu'une bonne partie de l'erreur aléatoire observée dans les données peut, en réalité, être améliorée par une meilleure information.

En conclusion, pour avoir une interprétation claire des données, il est important d'être en mesure de séparer l'information sur la force ou la magnitude de la relation et sa précision. Ceci est exactement ce que le processus d'estimation fait.

1.6.2. Les erreurs systématiques

Figure 2. Les erreurs systématiques ou biais



Adapté de Csizmadia et Collet 2006: Bias and Confounding in Pharmacoepidemiology³⁹⁸

Nous décrivons maintenant l'autre grande catégorie d'erreurs soit l'erreur systématique, qui s'appelle aussi le biais. En langage commun, le biais peut référer à une attitude prêtée ou adoptée à un individu ou même à un investigateur, mais elle peut aussi être utilisée pour décrire les erreurs systématiques présentes dans une étude. Une étude peut donc être biaisée pour trois raisons (Figure 2) : la manière dont les sujets ont été sélectionnés mène au biais de sélection; la manière dont les variables sont mesurées mène au biais d'information; la dernière raison est le facteur de confusion incomplètement

contrôlé. La manière la plus simple de distinguer des erreurs aléatoires des erreurs systématiques est d'imaginer qu'une étude puisse être augmentée en taille d'échantillon jusqu'à l'infini. Il y a certains types d'erreurs qui pourraient être réduits à 0 dans ces conditions; il s'agit des erreurs aléatoires. L'autre type d'erreurs n'est pas affecté en augmentant la taille de l'étude; il s'agit des erreurs systématiques – les biais.

L'erreur systématique peut s'immiscer dans les études épidémiologiques de multiples façons. Nous ferons un éventail des types de biais des plus communs, en les regroupant par catégories les plus reconnues : les biais de sélection, les biais d'information et la confusion.

1.6.2.1. Le biais de sélection

Le biais de sélection est une erreur systématique présente dans une étude qui dérive des procédures utilisées pour sélectionner les sujets de l'étude et des facteurs qui influencent la participation des individus à l'étude. Il est possible que l'association entre l'exposition et la maladie diffère des participants comparativement aux individus qui ne participent pas à l'étude. Toutefois, comme l'association entre l'exposition à la maladie parmi les individus ne participant pas à l'étude est normalement inconnue, la présence de biais de sélection peut généralement être inférée ou suspectée plutôt que observée. Le biais de sélection peut survenir du processus d'auto-sélection des individus (à participer dans une étude) tout comme il peut survenir des choix faits plus directement par les investigateurs. Ce biais est aussi appelé biais de distorsion de l'échantillon (*sample distortion bias*). Quatre types de biais de sélection apparaissent particulièrement importants : le biais de référence, le biais d'auto-sélection, le biais de prévalence et le biais protopathique.

1.6.2.1.1. Le biais de référence

Le biais de référence peut survenir si les raisons pour lesquelles le patient est référé à un hôpital ou à une clinique (par exemple), sont reliées au statut d'exposition, par exemple lorsque l'utilisation d'un médicament contribue au processus diagnostique. Cette

situation est particulièrement problématique lorsque la maladie se présente telle qu'un diagnostic précis n'est pas toujours obtenu.

L'exemple classique pour illustrer ce biais est la relation entre la consommation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et le risque d'ulcères gastriques. Lorsqu'un patient consommant un AINS présente une douleur abdominale, son médecin est plus susceptible de penser que ce patient a un ulcère gastrique compte tenu des effets secondaires bien décrits de cette médication. Le patient a donc plus de chance d'être référé à l'hôpital pour investigation diagnostique comparativement à d'autres patients se présentant avec une douleur épigastrique, une douleur abdominale similaire mais ne consommant pas d'AINS. Une étude cas-témoin basée sur des patients hospitalisés montrerait donc une association forte, mais biaisée, entre les ulcères gastriques non hémorragiques et l'utilisation de médication AINS. En contrepartie, ce biais ne se produirait pas nécessairement pour une étude de saignement gastro-intestinal sévère, puisque le diagnostic clinique est plus facile à faire.

L'examen du potentiel pour le biais de référence aide à interpréter les résultats d'études épidémiologiques successives conduites à des moments différents dans le temps. Il faut une étude initiale qui rapporte une association positive entre un médicament et une maladie pour que le phénomène du biais de référence débute et puisse entraîner une augmentation de la force de l'association au cours du temps même si la réelle association demeure constante ou même nulle.

Une solution générale pour le problème du biais de référence est de restreindre l'analyse aux cas plus sévères de la maladie. On peut alors présumer que pour la majorité des maladies, tous les cas sérieux seront éventuellement diagnostiqués de manière appropriée, et ce indépendamment de l'exposition préalable.

1.6.2.1.2. Le biais d'auto-sélection

Le biais d'auto-sélection peut survenir lorsque les participants à une étude décident eux-mêmes de participer ou d'arrêter de participer basé sur à la fois une exposition et un

changement d'un statut de santé. Dans ce cas, l'association observée dans l'échantillon de l'étude pourrait ne pas être représentatif de l'association dans la population source. Ce problème est particulièrement important pour les études rétrospectives soit de type cas-témoin ou de cohorte historique, parce qu'à la fois l'issue et l'exposition se sont déjà manifestées lorsque les sujets de l'étude sont recrutés.

L'exemple classique pour illustrer ce type de biais serait une étude où les malformations congénitales sont étudiées. On peut facilement imaginer que la mère d'un enfant atteint de malformation pourrait aussi avoir le désir de rapporter leur exposition qu'elle croit être causale. Ces mères pourraient être plus (ou moins) à risque de participer à cette étude.

De nos jours, les règles d'éthique de la recherche chez les humains étant strictes (à ce sujet), les patients doivent avoir un consentement éclairé avant de participer à une étude. Dans le cas des études prospectives, les patients doivent donc être informés des résultats attendus de l'effet de l'exposition étudiée. Ceci pourrait donc sélectionner certains patients qui ont un risque de survenue de l'événement différent de celui de la population source dont l'échantillon serait tiré.

D'une manière similaire, dans les essais cliniques randomisés contrôlés, on remarque souvent que les effets observés ne peuvent pas être reproduits en dehors des circonstances particulières de cette étude. Ces études étant souvent rigoureusement conduites, permettent de bien déterminer l'utilité (*efficacy*) d'une intervention. On questionne souvent la généralisabilité de ces études en bonne partie à cause des biais d'auto-sélection.

La généralisabilité des essais cliniques randomisés contrôlés est souvent mise en question en particulier à cause des biais d'auto-sélection. Les patients qui participent activement aux études ne sont pas représentatifs de la population en général, en particulier par leurs habitudes de vie que ce soit le tabagisme, l'exercice physique ou l'alimentation. Ces habitudes de vie, et bien d'autres facteurs, peuvent affecter les risques de survenue de la maladie et biaiser les trouvailles. À noter que ceci relève aussi un peu de la confusion.

Si en effet on peut mesurer avec précision les facteurs qui sous-tendent la participation active des patients à ces essais cliniques, on peut alors utiliser des méthodes pour contrôler ces facteurs comme on le fait pour contrôler la confusion.

Le problème du biais d'auto-sélection est commun en pharmaco-épidémiologie et doit être contrôlé à la phase de conception de l'étude. Tous les cas éligibles doivent être systématiquement identifiés et recrutés dans l'étude. Ceci représente un avantage indéniable des registres basés sur la population, où l'identification des prescriptions médicamenteuses est automatisée dans les banques de données médico-administratives.

1.6.2.1.3. Le biais de prévalence

Le biais de prévalence peut survenir lorsqu'une étude sélectionne des cas prévalents plutôt que des cas incidents ou nouveaux. Ceci est important puisque la prévalence est proportionnelle à la fois à l'incidence de la condition et à la durée de cette condition. Ainsi, une association avec la prévalence d'une condition peut être reliée plutôt à la durée de cette condition plutôt qu'à son incidence. Aussi, une association entre une exposition et les cas prévalents pourrait refléter une association entre un facteur pronostique plutôt qu'avec l'incidence de cette condition. Enfin, il est possible qu'une association significative avec les cas prévalents ayant un bon pronostic ne soit pas confirmée dans un groupe de patients plus large de cas incidents.

Nous pourrions aussi inclure dans cette définition la prévalence de certaines interventions qui pourraient biaiser la mesure de l'utilité d'une intervention dans un essai randomisé contrôlé. Un exemple de la littérature récente en cancer de la prostate illustre bien ce fait. Deux études randomisées contrôlées évaluant l'effet du dépistage du cancer de la prostate sur la mortalité ont été publiées dans le même numéro d'un prestigieux journal. L'étude américaine (PLCO)²⁵ a démontré une absence de différence de la mortalité par cancer de la prostate (rapport de taux 1,13; IC 95%, 0,75 à 1,70) après un suivi médian de 7 ans. L'étude européenne (ERSPC)²⁴ a démontré une réduction de la mortalité par cancer de la prostate (rapport de taux 0,80; IC 95% 0,65 à 0,98) après un suivi médian de 9 ans. Ces

études ont fait couler beaucoup d'encre mais le point principal soulevé biaisant cette étude demeure le biais de sélection de la population à étudier en particulier aux États-Unis relativement à la population américaine. La prévalence de dépistage aux États-Unis était très élevée : elle a été évaluée à 40% des patients inclus dans le groupe contrôle mais était en réalité supérieure à cette proportion. Il s'agit donc, en une certaine forme, d'un biais de prévalence. Probablement pour ce seul problème méthodologique, l'étude américaine n'a pas démontré d'effets significatifs. L'estimateur du rapport de taux à 1,13 était en effet plus grand que l'absence d'association, suggérant une tendance du dépistage à augmenter la mortalité par cancer de la prostate. Ceci est évidemment peu probable dans une étude dont le devis mandatait une revue précise de la cause de la mortalité. Aussi, la condition étudiée (cancer de la prostate) présente une séquence d'événements typiques menant au décès par cancer et ce dernier peut donc être identifié avec une bonne précision; un biais de détermination de la cause de la mortalité apparaît donc peu probable. Enfin, l'intervalle de confiance à 95% s'étalant de 0,75 à 1,70 nous porte plutôt à croire de ne pas rejeter l'hypothèse nulle. Ce sont en effet l'analyse des biais de l'étude américaine et l'interprétation de ses mesures d'association qui nous font conclure en l'absence d'effet du dépistage dans cette étude, à ce point dans son suivi.

Afin de contrôler le biais de prévalence, il est donc très important de bien choisir sa population d'étude. En particulier, on peut limiter le recrutement de cette population à des cas réellement incidents avec une séquence temporelle clairement documentée. Il est ensuite possible d'aller mesurer l'exposition qui est pertinente à l'incidence de cette condition.

1.6.2.1.4. Le biais de protopathique

Ce terme a été utilisé en premier par Feinstein en 1985. Il peut survenir lorsqu'un traitement ou une exposition particulière a été débuté, arrêté ou changé à cause de la manifestation initiale causée par la maladie ou l'issue. Cette possibilité démontre l'importance cruciale d'une compréhension complète des mécanismes pathophysiologiques du développement de la maladie lorsqu'on conçoit des études

épidémiologiques. L'exemple classique est celui du syndrome de Reye chez l'enfant et son association avec l'aspirine. Une forte fièvre est une des manifestations initiales de la condition et était communément traitée par l'aspirine. On a alors associé l'aspirine au développement du syndrome de Reye qui dans ses phases plus tardives comprend une encéphalopathie et une stéatose hépatique. Mais c'est en réalité le premier symptôme du syndrome de Reye qui a mené à la consommation d'aspirine non pas le contraire. Un autre exemple classique est celui de la prise d'aspirine et le cancer du côlon. Les patients ayant du sang dans les selles ont tendance à arrêter l'aspirine puisque cette médication éclaircie le sang. Or, la présence de sang dans les selles constituait la première manifestation précoce d'un cancer du côlon, alors une association négative entre la consommation d'aspirine au moment du diagnostic et le cancer du côlon pourrait être observée.

1.6.3. Les biais d'information et les erreurs de classement

Une erreur systématique peut survenir dans une étude parce que l'information collectée à propos ou à partir des sujets est erronée. On réfère fréquemment à cette information erronée comme étant une erreur de classement : la variable est mesurée sur une échelle catégorique et par erreur le sujet est intégré dans une catégorie incorrecte. Par exemple, un fumeur de grande intensité qui est catégorisé comme un fumeur de petite intensité, ou encore comme un non-fumeur, représente une erreur de classement.

L'erreur de classement peut survenir autant pour l'exposition que pour la maladie. Cette erreur peut être différentielle ou non-différentielle. Ces termes réfèrent au mécanisme sous-jacent à l'erreur de classification. Dans le cas de l'erreur de classement de l'exposition, l'erreur est non différentielle si elle n'est pas reliée à la présence ou l'occurrence de la maladie; si l'erreur de classement de l'exposition est différente pour les sujets avec et sans maladie, l'erreur est différentielle. Similairement, l'erreur de classement de la maladie est non différentielle si elle n'est pas reliée à l'exposition; sinon, elle est différentielle. Nous décrirons plus loin, des exemples classiques d'erreurs de classement

différentielles. Ces erreurs de classement peuvent soit exagérer ou sous-estimer un effet. En contrepartie, une erreur de classement non-différentielle mène à un biais plus prédictible que l'erreur de classement différentielle. L'erreur de classement non-différentielle d'une exposition dichotomique tend à produire des estimations de l'effet qui sont diluées ou plus près de la valeur nulle ou sans effet, que de l'effet réel. S'il n'y a pas d'effet réel, l'erreur de classement non-différentielle de l'exposition ne va pas biaiser l'estimation de l'effet.

L'erreur de classement la plus envahissante, qui affecte chaque étude épidémiologique jusqu'à un certain point, est l'erreur de classement non-différentielle. Celle-ci ne dépend pas du statut de l'individu pour l'autre variable. Ainsi, l'erreur de classement de l'exposition ne dépend pas de la présence ou de l'occurrence de la maladie; inversement, l'erreur de classement de la maladie ne dépend pas du statut d'exposition de l'individu.

Un sous-diagnostic représente une erreur de classement de la maladie ou de l'issue. Si cette tendance au sous-diagnostic est la même pour les sujets exposés et non exposés, alors cette erreur de classement est non différentielle. Par exemple, si on accepte que la consommation de vin rouge n'est pas reliée au tabagisme et que l'on mène une étude sur la relation entre la consommation de vin rouge et le développement de l'emphysème, alors, il n'y a pas de raison de croire que ceux qui boivent du vin rouge aient une tendance plus ou moins grande à être diagnostiqué avec de l'emphysème, si le sujet en est porteur. Ceci contrairement aux sujets fumeurs. Conséquemment, quelques individus porteurs d'une maladie d'emphysème ne seront pas diagnostiqués. Dans le cas présent, cette proportion d'individus qui n'ont pas leur maladie diagnostiquée est présumée être la même pour ceux qui boivent et ceux qui ne boivent pas de vin rouge.

1.6.3.1. Le biais de mémoire

Le biais de mémoire survient dans les études cas-témoins où les sujets sont interviewés pour mesurer l'exposition après que la maladie ou l'événement soit survenu.

Le problème général est la difficulté de se souvenir de certains faits et de rapporter des expositions antérieures. Ceci affecte, jusqu'à un certain point, tous les individus et tend à mener à une erreur de classement non-différentielle plutôt que différentielle. Par contre, plusieurs situations particulières mènent à un biais de mémoire, soit à un rappel différentiel de l'information antérieure. Ceci mène à une erreur de classement différentielle. L'exemple classique de ce biais est une étude cas-témoins des bébés nés avec des malformations congénitales alors que l'information sur l'exposition est obtenue à partir d'interviews des mères après la naissance. Les mères qui ont accouché d'un bébé avec une malformation congénitale sérieuse sont présumées avoir une mémoire précise de plusieurs expositions même durant le début de la grossesse, comme prendre certaines médicaments en vente libre ou avoir eu de la fièvre par exemple, parce que la naissance de l'enfant atteint sert de stimulus important pour la mère de rechercher et considérer les causes potentielles. Par contre, les mères ayant accouché d'un bébé normal n'ont pas ce stimulus comparable pour examiner leur mémoire et peuvent conséquemment ne pas penser à certaines expositions antérieures. Cet exemple illustre bien que ce biais est propre aux études rétrospectives où l'entrevue des sujets mène à l'identification de l'exposition une fois l'issue survenue. Elle illustre bien qu'elle peut aussi être différentielle en fonction de la maladie ou de l'issue à l'étude.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour prévenir le biais de mémoire. Une approche est de définir les questions qui vont aider à préciser la mémoire des sujets. Améliorer la précision du processus de souvenance diminuera le biais de mémoire puisqu'il limitera les imprécisions particulièrement chez les sujets contrôles. Une autre approche est d'utiliser un groupe contrôle entièrement différent qui ne sera pas sujet, ou qui le sera moins, au processus imparfait de souvenance. Par exemple, les mères de bébés nés avec malformation congénitale autre que celle à l'étude pourraient mener à une souvenance des expositions antérieures comparable à celles des mères représentant les cas à l'étude. Enfin, une autre approche pour éviter le biais de mémoire est de conduire une étude qui n'utilise pas une technique d'interviews pour obtenir l'information mais, plutôt, d'utiliser de

l'information déjà disponible dans des dossiers médicaux ou dans des banques de données de prescriptions médicamenteuses administratives ou autres.

1.6.3.2. Le biais de détection

Contrairement au biais de mémoire précédemment discuté, le biais de détection peut affecter les études soit de type cas-témoins ou cohortes. Dans le cas des études cas-témoins, l'évaluation de l'exposition pourrait ne pas se faire de manière similaire chez les cas et les contrôles. Par exemple, l'évaluation de l'exposition peut être plus approfondie, voire acharnée, chez les cas seulement. Dans les études de cohortes, les procédures de suivis pour détecter des effets secondaires ou toute autre issue, peuvent différer en fonction du statut d'exposition des participants. L'exemple classique de cette situation est illustré par les femmes prenant des suppléments hormonaux après la ménopause. Ces dernières sont susceptibles de voir leur médecin plus fréquemment que les autres femmes. Ces femmes exposées ont donc plus de chance d'être examinées pour un cancer de l'endomètre ou du sein, ou pour toute autre condition. Ce suivi différentiel peut donc mener à un nombre excessif de maladies diagnostiquées dans le groupe traité et donc mener à un risque faussement élevé. A contrario, pour d'autres issues, cette situation peut mener à des soins préventifs plus complets et donc mener à un risque diminué.

Un exemple important tiré de la littérature urologique est celui de la vasectomie en tant que facteur de risque de développement du cancer de la prostate. Plusieurs publications ont éveillé la possibilité que cette intervention contribue au développement du cancer de la prostate. Quelques méta-analyses ont été publiées sur le sujet (voir section 'Facteurs de risque du cancer de la prostate'). Il faut garder en tête, lors de l'interprétation de ces données, que le suivi d'un homme ayant consulté un médecin, probablement un urologue, pour subir une vasectomie sera probablement différent de celui d'un autre homme n'ayant jamais consulté d'urologue. La question demeure ouverte quant à la présence d'un taux différentiel de tests et d'exams de dépistage du cancer de la prostate. Certains auteurs concluaient que bien qu'une légère augmentation du risque puisse être observée, on concluait à une possibilité de biais de détection expliquant cette association

positive compte tenu que la mesure était très sensible au type de population à l'étude ainsi au type de devis d'étude. Aussi, le graphique en entonnoir (*funnel plot*) suggérait une probable existence de biais de publication⁶⁰. D'autres soulèvent que l'association positive ne serait probablement pas causale étant donnés les probables biais de détection sous-jacents³⁹⁹. Enfin, pour ajouter à la controverse, une autre étude conduite en Inde a démontré une association non-statistiquement significative mais tout de même suggestive d'une association positive entre la vasectomie et le cancer de la prostate⁴⁰⁰. Cette étude est particulièrement intéressante du fait de la cohorte choisie : il n'y avait pas de dépistage du cancer de la prostate routinier dans cette population. Dans cette étude, les auteurs concluaient que le biais de détection était donc peu probable pour expliquer l'association possible observée. La controverse est donc encore bien vivante, et ceci illustre bien à quel point le biais d'information (ici de détection) peut être pernicieux et à quel point il peut être difficile d'en tenir compte.

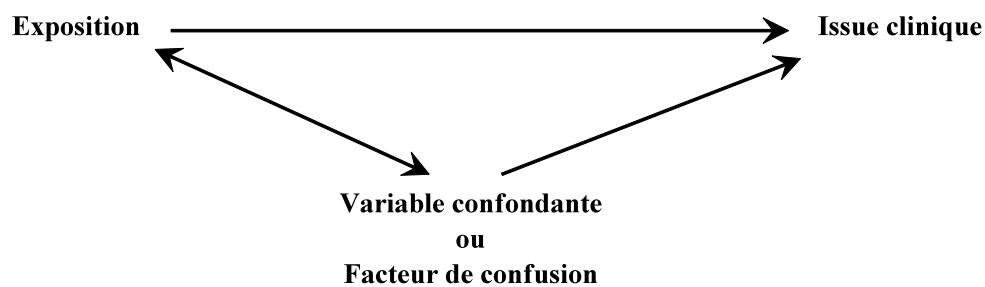
1.6.3.3. Le biais du temps immortel

Cette erreur de classement survient lorsque les groupes de comparaison d'une étude sont déterminés avec de l'information disponible durant le suivi. L'exposition est, en fait attribuée de manière erronée sur une certaine période de temps. Plus spécifiquement, il s'agit de la période de suivi durant laquelle, faute au devis d'étude, le décès ou l'issue à l'étude ne peut pas survenir. La façon la plus typique d'illustrer ce biais est dans les études de pharmaco-épidémiologie où un sujet remplit sa première prescription du médicament à l'étude plus tard dans le temps, après la survenue d'un événement définissant le début du suivi. Cette période de temps est, par définition, considérée comme immortelle, en ce que l'issue ne peut pas survenir chez cet individu particulier. Ce temps immortel, seulement accumulé chez les sujets considérés exposés, va donc typiquement biaiser les résultats en faveur du traitement à l'étude en attribuant un avantage de survie factice au groupe traité.

Ce biais sera discuté en détail dans un article complet au chapitre 2.3. où il sera illustré par de multiples exemples qu'il peut être rencontré dans d'autres types d'étude que la pharmaco-épidémiologie.

1.6.4. Le facteur de confusion

Figure 3. Illustration du rôle du facteur de confusion dans la relation entre exposition et issue clinique



Adapté de Csizmadi et Collet 2006: Bias and Confounding in Pharmacoepidemiology³⁹⁸

La confusion demeure une question centrale dans la conception des études épidémiologiques. Une définition simpliste de la confusion serait le mélange des effets : cette définition implique que l'effet de l'exposition est mélangé avec l'effet d'une autre variable; ceci menant à un biais.

En situation de confusion, l'effet réel de la variable d'exposition principale peut ou pourrait ne pas avoir d'effet. Par contre, la variable confondante doit absolument avoir un effet sur l'issue ou la maladie pour être confondante, tel qu'illustré dans la Figure 3.

Les prédictors de la survenue d'une maladie ne sont pas tous des facteurs de confusion. Pour que la confusion survienne, un prédictor de l'occurrence de la maladie doit aussi être débalancé sur les catégories d'exposition. Un exemple classique d'une potentielle variable de confusion qui ne l'est en réalité souvent pas est l'âge. En effet, l'âge est souvent un facteur de risque pour une maladie particulière. L'âge n'est toutefois pas

confondante sauf si la distribution d'âge des individus dans les différentes catégories d'exposition diffère. À l'inverse, et ce qui arrive fréquemment pour la variable âge, si toutes les catégories d'exposition contiennent des individus qui ont une distribution d'âge identique à celle des individus dans d'autres catégories d'exposition, alors la comparaison des taux de maladies au travers des différentes catégories d'exposition ne sera pas influencée par l'effet de l'âge.

L'exemple classique de confusion rapporté dans plusieurs *textbooks* d'épidémiologie est le travail de Stark et Mantel⁴⁰¹. L'étude démontre une augmentation frappante du syndrome de Down avec une augmentation du nombre de naissances préalable. En effet, la prévalence du syndrome de Down passe d'un taux de 0.6 par 100,000 naissances vivantes progressivement en augmentation à presque 1.7, selon que la naissance est la première ou la cinquième et plus d'une même mère, respectivement. Ceci suggère un effet du nombre de naissances préalable sur la survenue du syndrome de Down. Toutefois, le nombre de naissances est fortement corrélé avec l'âge de la mère au moment de la naissance en question. La prévalence du syndrome de Down à la naissance en fonction de l'âge de la mère présente une tendance beaucoup plus forte. En effet, elle varie d'un taux de moins de 0.5 bébés par 1,000 naissances vivantes pour les mères d'un âge de moins de 20 ans et augmente progressivement jusqu'à un taux de plus de 8 bébés affectés par 1,000 naissances vivantes pour les mères de 40 ans et plus. Lorsqu'on examine l'effet de la prévalence du syndrome de Down à la naissance stratifié par à la fois l'ordre de naissances (ou le nombre de naissances préalable), et l'âge de la mère simultanément, on constate que l'ordre de naissances n'a pas d'effet qui lui est propre. Seulement l'âge de la mère à la naissance du bébé est fortement associé.

On peut conclure d'un de ces premiers exemples de confusion où la stratification a été appliquée que l'effet brut (*crude effect*) de l'ordre de naissances (ou du nombre de naissances préalable) était entièrement une résultante de la confusion par l'âge maternel. La question suivante devient est-ce que l'âge maternel est confondu par l'ordre à la naissance? Comme cette dernière variable n'avait pas d'effet en soi, l'âge maternel n'était

pas confondu par cette dernière. Toutefois, elle est probablement confondue par d'autres facteurs. En effet, l'âge n'est qu'un marqueur temporel et ne peut pas causer en lui-même des changements biologiques qui entraînent le syndrome de Down. Il existe des effets biologiques qui surviennent avec le processus de vieillissement qui mènent à une augmentation abrupte de la survenue du syndrome de Down chez les bébés de mères plus vieilles. L'âge de la mère est donc un *proxy* pour des facteurs biologiques qui demeurent à être identifiés qui, eux, expliquent la survenue du syndrome de Down.

Tel que discuté dans la section sur l'erreur en épidémiologie, ceci est un bel exemple qu'au fur et à mesure que les couches de confusion sont connues et expliquées, nous parvenons progressivement à une compréhension causale plus profonde ou réaliste des mécanismes biologiques sous-tendant les associations observées. Cette quête de la compréhension biologique n'a pas une fin claire en soi : avec les avancées technologiques et l'avancement de l'état des connaissances, il y a toujours de l'espace pour une compréhension biologique plus en profondeur.

Les propriétés d'un facteur de confusion peuvent donc être résumées de la manière suivante :

- a) Un facteur de confusion doit être associé à la maladie ou l'issue, soit en tant que cause ou en tant que *proxy* pour une autre cause. Ce facteur ne doit pas être un effet de la maladie.
- b) Le facteur de confusion doit être associé à l'exposition.
- c) Le facteur de confusion ne doit pas être un effet de l'exposition. Autrement dit, le facteur ne doit pas être une étape intermédiaire dans la cascade causale qui lie l'exposition à la maladie ou l'issue. L'exemple classique de ceci est le lien entre la diète riche en graisses saturées et l'artériosclérose. En effet, cette diète mène à des niveaux plus élevés de lipoprotéines à faible densité (LDL) dans le sang et ce haut niveau de LDL mène à l'artériosclérose. Le LDL est à la fois associé à la diète et l'artériosclérose. Pourtant, le niveau de LDL n'est pas un facteur de

confusion de la relation entre la diète et l'artériosclérose; elle est en réalité une résultante de l'exposition et plutôt explique cette association.

1.6.4.1. Les sous-types de facteurs de confusion

La confusion peut survenir pour de nombreuses raisons dans de nombreuses situations. Tel qu'illustré dans la section précédente à propos des mécanismes menant à la confusion, tout facteur peut potentiellement mener à une confusion et déformer l'association réelle entre une variable et une issue. Ceci est vrai pour toute étude épidémiologique en général. En pharmaco-épidémiologie, on peut observer de la confusion par co-médication. Les patients prennent fréquemment plus d'un médicament à la fois et il peut parfois être difficile d'isoler l'effet spécifique d'une médication. Il est donc invraisemblable de croire qu'avec un devis d'étude non-expérimental l'on puisse isoler parfaitement l'effet d'un facteur d'exposition sur la survenue d'un événement clinique.

1.6.4.1.1. Le biais lié à l'observance thérapeutique

L'observance de prescription médicamenteuse varie beaucoup d'un individu à l'autre et en fonction du contexte thérapeutique et peut avoir en soi un effet sur la survenue de la maladie.⁴⁰² Ceci est un *proxy* pour d'autres caractéristiques telles que les attitudes personnelles pouvant mener à un effet sur la maladie en question. Rothman expose un concept de biais de sélection pronostique détaillé dans la discussion de l'article portant sur le cancer de la prostate (chapitre 2.1.) qui est similaire à l'effet du biais discuté ici. En effet, l'observance thérapeutique est une caractéristique personnelle d'un individu qui est associée à d'autres attitudes pouvant mener cet individu à accorder plus d'importance à sa santé en général et à rechercher et peut-être avoir un niveau de soin différentiel.

Une étude de cohorte prospective récente⁴⁰³ basée sur les données médico-administratives de la Colombie Britannique illustre particulièrement bien l'importance de ce biais. Des issues biologiquement et causalement non reliées à l'utilisation de statines ont été associées au degré d'observance thérapeutique chez plus de 140 000 nouveaux utilisateurs de statines en prévention primaire, âgés en moyenne de 61 ans. Les individus

présentant une observance thérapeutique la plus élevée étaient moins à risque d'avoir un accident automobile (HR=0,75; IC 95%=0,72-0,79) mais étaient plus à risque d'utiliser des services de santé de dépistage (HR=1,17; IC 95%=1,15-1,20) que les patients présentant une observance moindre. Cette étude démontre que les patients ayant une observance thérapeutique plus grande aux statines ont des comportements personnels plus axés vers la santé que ceux qui ont une observance thérapeutique moindre. Ceci met l'accent sur la prudence nécessaire à l'interprétation d'effets protecteurs de médication de prévention qui surprennent.

1.6.4.1.2. Le biais d'indication

L'indication pour une prescription est probablement le facteur de confusion le plus important en pharmaco-épidémiologie parce que, en théorie, il y a toujours une raison pour une prescription et cette raison est souvent associée à l'issue (*outcome*) d'intérêt. On réfère à ce concept sous plusieurs dénominations : biais d'indication, *chanelling*, ou confusion par la sévérité (de la condition).

Le problème de la confusion par indication peut être conceptualisé dans un sens similaire au biais de sélection, parce que la décision de prescrire peut être perçue comme un moyen de sélectionner un groupe de patients. Si ce processus de sélection est aussi relié à l'issue (ce qui est souvent le cas, particulièrement lorsque l'efficacité d'un médicament est étudiée), un biais est alors présent. Un élément clé est que, pour un médicament donné, la nature de la confusion par indication n'est pas universelle mais est directement reliée à l'issue étudiée, aux pratiques de prescription qui peuvent changer dans le temps ou dans l'espace, d'un pays à l'autre, par exemple.

Le terme *channeling* a été créé par des Néerlandais, Petri et Urquhart.⁴⁰⁴ Il englobe et illustre les différents aspects subtils qui peuvent affecter la prescription d'un médicament, plutôt qu'un autre de même classe pharmacologique. Ces différents facteurs affectant la 'canalisation' d'un médicament vers certains groupes de malades. Il est un aspect important du biais d'indication et décrit ici.

Lorsqu'un nouveau médicament apparaît sur le marché, il entre en compétition avec les méthodes de traitement préexistantes pour les mêmes conditions. Il sera publicisé comme étant généralement supérieur mais, plus souvent, des avantages étroitement définis seront les seuls pouvant être identifiés. Les cliniciens pourraient adopter le nouveau traitement à grande échelle ou, plus souvent, sélectivement. Typiquement, la mise en marché du médicament—et son marketing—sera axée sur un profil particulier de malades. Le *channeling* est cette utilisation—prescription—de médicament par groupe de patients qui ont des comorbidités particulières ou des susceptibilités à certains problèmes. Ceci peut confondre l'association mesurée entre deux médicaments (nouveau et ancien, par exemple) et l'issue. Certains auteurs⁴⁰⁴ considèrent le *channeling* comme une forme de biais de répartition (*allocation bias*), où les interventions, auto-sélectionnées ou cliniquement assignées, sont données à des individus avec des différences pronostiques importantes, non pas au hasard.

Un autre facteur pouvant affecter la prescription d'un médicament est l'âge du patient et de son médecin. Comme ceux-ci vieillissent ensemble, les patients plus vieux peuvent être plus à risque d'utiliser des vieux médicaments puisque leurs médecins—plus vieux—ont tendance à adopter plus lentement les nouveaux médicaments.

Un bel exemple d'un essai de quantification du *channeling* a été faite chez des patients asthmatiques⁴⁰⁴. La proportion d'utilisateurs de stéroïdes inhalés (un médicament de deuxième ligne rapporté au moment de cette étude, bien que maintenant un traitement de première ligne⁴⁰⁵) variait considérablement d'un beta-agoniste inhalé à l'autre (un médicament de première ligne): 23% des utilisateurs d'albuterol, 35% des utilisateurs de terbutaline et 42% des utilisateurs de fenoterol utilisaient aussi des stéroïdes inhalés. Ces données supportent que les médecins avaient tendance à prescrire le fenoterol chez des patients plus sévèrement atteints et peut mener à des associations non causales entre les beta-agonistes et des conséquences graves de l'asthme.

Une autre caractéristique importante du biais d'indication est qu'il est très difficile de contrôler pour sa présence. Quoiqu'il soit théoriquement possible de le contrôler, en

pratique, il peut être impossible d'obtenir une estimation précise de l'effet de cette variable confondante, même si la raison de prescription paraît évidente. La raison est que « l'indication » est un phénomène complexe et multifactoriel qui implique la connaissance du médecin et plusieurs autres facteurs, dont ceux discutés précédemment, et d'autres parfois plus nébuleux, qui peuvent agir dans des directions différentes.

Le biais d'indication n'est habituellement pas un problème pour l'étude dont l'issue est un effet inattendu ou des effets secondaires, bénéfiques ou néfastes. Dans cette situation, l'indication pour traitement n'est habituellement pas reliée à l'issue d'intérêt. Par exemple, dans une étude du saignement gastro-intestinal consécutivement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens, les possibles indications pour traitement, comme l'arthrite, la dysménorrhée et la douleur aiguë, n'ont peu ou pas de relation en eux-mêmes avec le risque de saignement gastro-intestinal. Un autre exemple qui m'intéresse est une étude du risque de progression de cancer de la vessie dont l'exposition d'intérêt est l'utilisation de statines. L'indication pour l'utilisation de statine, soit la dyslipidémie ou la prévention primaire, secondaire ou tertiaire, des maladies cardiaques n'a peu à avoir avec le cancer de la vessie. À moins que le profil lipidique du patient puisse avoir un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses, ce qui n'est pas connu.

Pour les études observationnelles à propos d'effets bénéfiques anticipés, le biais d'indication est important. Ici, on s'attend à ce que l'indication de traitement soit reliée à l'issue. Par exemple, une étude comparant la mortalité post infarctus du myocarde entre des utilisateurs de β -bloqueurs versus les non-utilisateurs sera confondue par l'indication du β -bloqueur. En effet, l'indication qui peut être le trouble du rythme cardiaque ou de la tension artérielle est reliée au risque de mortalité. Quoique les récentes lignes directrices⁴⁰⁶ supportent la prescription de β -bloqueurs chez tous les patients et cette situation deviendra presque un exemple du paragraphe suivant.

Plusieurs mesures peuvent être prises pour contrôler le biais d'indication. Le chercheur doit toutefois commencer par identifier si ce facteur de confusion est présent ou pas. En effet, pour certaines questions de recherche, même celles à propos d'effets

bénéfiques escomptés, l'indication de prescription—ou d'utilisation de l'intervention—n'est pas reliée à l'issue d'intérêt. Si la décision de traiter ou pas n'est pas basée sur une indication formelle mais sur d'autres facteurs qui ne sont pas nécessairement reliés à l'issue, comme la disponibilité du médicament, ou des pratiques culturelles ou religieuses, il n'y a alors pas d'opportunité pour la confusion par indication. Cette situation survient fréquemment dans les études de prévention primaire : l'utilisation de la vaccination contre la rougeole chez des enfants en parfaite santé, par exemple.

Il y a plusieurs situations où le biais d'indication peut exister et peut théoriquement être contrôlé⁴⁰⁷. Quand l'indication peut être suffisamment bien mesurée, alors les techniques épidémiologiques traditionnelles d'exclusion, d'appariement (*matching*), de stratification et de modélisation mathématique peuvent être appliquées. L'indication peut être suffisamment bien mesurée si elle est i) dichotomique, ou ii) quantifiable.

i) Dans certaines conditions, l'indication est dichotomique ou binaire, sans gradation de sévérité; l'indication est présente ou pas. Un exemple clair est la mère avec un statut Rhésus négatif qui donne naissance à un enfant Rhésus positif, en tant qu'indication pour immunoglobuline. Parmi ceux qui ont l'indication, la variation du traitement est basée sur une philosophie du médecin ou, plus probablement, une omission par inadvertance ou négligence. Une solution simple, ici, pourrait être de restreindre l'analyse spécifiquement à cette condition.

Dans d'autres situations, la gradation de l'indication peut sembler exister, mais en autant qu'elle n'est pas reliée à la décision de traiter, la gradation n'est pas réellement un détail de l'indication. On peut alors appliquer les techniques pour gradation dichotomique. Un exemple est la pénicilline comme prophylaxie pour l'endocardite bactérienne chez des patients avec sténose congénitale de l'aorte qui subissent une extraction dentaire. Bien que la sténose aortique ait une gradation de sévérité, la décision de traiter, par contre, ne dépend pas de cette variation. A noter que dans le futur, les études à ce propos devront tenir compte d'une autre variable, soit le changement récent (vers la non nécessité de l'antibio-

prophylaxie) dans les recommandations officielles⁴⁰⁸. De la même manière, la gradation de sévérité peut aussi ne pas être reliée à l'issue.

ii) Dans certaines conditions, l'indication peut être quantifiable. Pour être confondante, une tierce variable doit être en lien à la fois avec la cause potentielle *et* avec l'issue⁴⁰⁹. Le chercheur peut donc contrôler une potentielle variable confondante en la mesurant et en l'ajustant pour sa relation avec l'un ou l'autre. La mesure doit être sur une échelle (ordinaire ou quantitative) qui implique une force d'indication ou une probabilité d'issue. Par exemple, la prophylaxie avec isoniazide pour un patient asymptomatique chez qui un test cutané de tuberculine (PPD) devient positif. La taille (en mm) de la réaction cutanée peut être perçue comme une mesure du risque futur de tuberculose. Ici, l'indication, mesurable, peut être quantifiée et tenue en compte lors de l'analyse.

Récemment, les chercheurs ont commencé à utiliser le *propensity score* à cette fin. Cette approche utilise une modélisation mathématique pour prédire l'exposition, plutôt que pour prédire l'issue. Ceci est, essentiellement, une mesure directe de l'indication. Le *propensity score* peut ensuite être utilisé pour créer des catégories de probabilité d'exposition et d'ajuster pour ces catégories dans l'analyse. Cette approche est très attrayante, sauf qu'elle repose entièrement sur la capacité d'identifier et de mesurer les variables qui sont les vraies prédictrices de ces choix thérapeutiques. Qui plus est, cette approche est avantageuse seulement lorsqu'il y a sept ou moins événements d'issue par variable confondante.

Dans certaines situations où il est incontrôlable, le problème du biais d'indication est considéré si important qu'il invalide les approches non-expérimentales pour les études d'effets bénéfiques des médicaments. Par contre, ces approches peuvent démontrer, au moins qualitativement, un certain degré d'effet bénéfique. Spécifiquement, un certain degré de confiance peut être édifié sur l'effet observé lorsque le biais d'indication devrait mener à une issue clinique pire chez les patients traités, mais que ceux-ci présentent une issue observée plus favorable.

Idéalement, ces questions ne devraient être étudiées que par des essais cliniques randomisés. Par contre, bien que des essais cliniques randomisés post marketing soient utiles, ils sont limités par plusieurs des mêmes problèmes logistiques, éthiques et d'artificialité de l'environnement médical rencontrés dans les essais cliniques pré marketing.

1.6.5. Contrôle de la confusion

La confusion est une erreur systématique que les investigateurs visent à enlever d'une étude. Différentes méthodes générales peuvent servir à prévenir la confusion au moment de la conception de l'étude. D'autres méthodes permettent de minimiser l'effet de la variable confondante voire d'éliminer son effet, au moment de l'analyse.

1.6.5.1. Prévention de la confusion

Deux méthodes peuvent être utilisées pour prévenir la confusion : la randomisation et la restriction.

1.6.5.1.1. La randomisation

Dans un devis d'études expérimentales, un investigateur peut assigner l'exposition à l'étude d'une manière aléatoire au sujet d'étude. Ce processus aléatoire comporte de nombreux avantages puissants. Avec une population d'étude suffisamment large, la randomisation produit des groupes d'étude qui ont une distribution similaire de toutes les caractéristiques. Ceci permet donc d'équilibrer entre les groupes les facteurs confondants connus. D'une manière encore plus importante, ce processus aléatoire permet aussi d'assurer une distribution équitable entre les groupes des facteurs de confusion qui ne sont pas connus. Ainsi, même les facteurs de risque de confusion qui ne sont pas encore connus ne confondront pas un essai randomisé si la taille échantillonnale de l'étude est suffisamment grande pour équilibrer ces facteurs. Le corollaire de ceci est que la randomisation ne garantit pas l'absence complète de confusion : un processus aléatoire peut

encore mener à des différences entre les groupes. Ceci survient lorsque les tailles échantillonnelles sont petites.

1.6.5.1.2. La restriction

Contrairement à la randomisation, la restriction ne peut pas contrôler pour des facteurs de confusion inconnus. Il est possible de prévenir la confusion par des facteurs connus en restreignant la population d'étude. L'exemple classique est une étude de la consommation d'alcool et le cancer de la gorge. Le tabagisme est clairement une variable confondante et peut être éliminé de l'étude. On peut confiner l'étude aux non-fumeurs ce qui élimine donc l'effet confondant du tabagisme. Il est impossible, toutefois, d'étudier des effets interactifs de cette manière.

Le processus de restriction peut même être utilisé dans des expériences en addition au processus aléatoire pour augmenter le degré de certitude que certains facteurs de confusion ne surviennent pas. Par exemple, des expériences de laboratoire sur des animaux seront souvent conduites sur des souris provenant d'une seule lignée. Cette lignée pourra avoir le même génotype, le même âge et souvent le même sexe si on pense que ça peut être une variable importante.

L'objectif ultime de ceci est d'atteindre un niveau de certitude élevé quant à la validité interne de l'étude. En effet, une école de pensée insiste sur le processus d'inférence scientifique. Ceci demeure le processus le plus important : moins il y a de confusion, plus l'inférence scientifique peut être certaine. Ainsi, la restriction augmente l'habilité de conduire ce processus d'inférence en épidémiologie, d'une manière un peu similaire à ceux qui travaillent sur des animaux de laboratoire.

Ceci peut paraître en opposition au principe de représentativité de l'échantillon d'étude. Ce principe voudrait baser une étude sur une population qui représente la population cible d'intérêt. Lorsqu'un chercheur définit sa population d'étude avec le seul objectif qu'elle soit représentative de la population en général, afin qu'il puisse généraliser

ses conclusions à une population plus large, il peut, en contrepartie, diminuer la validité interne de son étude. C'est-à-dire qu'il peut miner capacité d'arriver à une conclusion vraie à propos du concept sous-jacent à l'association observée. Ceci représente l'inférence scientifique.

1.6.5.2. Contrôle de la confusion au moment de l'analyse

Différentes méthodes d'analyses de données collectées existent pour corriger les biais reliés au facteur de confusion. Ils seront survolés dans cette section.

1.6.5.2.1. La standardisation

La standardisation permet d'éliminer, dans la mesure du possible, l'effet de variables connues et mesurées tel que l'âge, le sexe ou autres.

Le processus de standardisation directe utilise la distribution d'une variable dans une population de référence. On choisit, d'une manière arbitraire, une population de référence pour laquelle on pondère la proportion de classe de facteurs. Par exemple, on peut pondérer la distribution d'âge. Il suffit de mesurer les taux spécifiques dans chaque catégorie d'âge et d'appliquer le facteur de pondération commun aux deux populations d'étude de manière à rendre comparable les taux entre chacune des populations. Pour l'âge, on appellera donc le taux global âge standardisé ou âge ajusté.

Le processus de standardisation indirecte applique les taux spécifiques à chacun des strates de la variable confondante à la distribution de la population cible de manière à calculer le nombre attendu de l'issue à l'étude. On peut ensuite calculer le ratio de décès observé et le comparer au nombre de décès attendus suite au processus de standardisation indirecte. On peut donc calculer des ratios de mortalité standardisés si l'issue est la mortalité. Sinon on appelle ce ratio le ratio standardisé de morbidité.

1.6.5.2.2. La stratification

La stratification permet d'explorer l'effet d'une variable par strate d'une autre variable. Elle permet de quantifier l'effet différentiel de la variable stratifiante sur le taux global. Ceci illustre comment la variable de stratification est confondante. Il est ensuite possible de grouper les résultats du processus de stratification en un résultat global pondéré d'une manière similaire au processus de standardisation. La technique la plus répandue de mesure de pondération a été établie par les travaux de Mantel et Haenzel.

Ce processus de stratification est facile à décrire et très intuitif. Toutefois, il comporte certaines limites : de stratifier sur plusieurs facteurs confondants à la fois peut être problématique puisque chacune des strates peut éventuellement devenir trop petites pour être comparables. Parfois le processus de sous-stratification peut mener à une perte d'information lorsque des catégories de sous-stratification se retrouvent sans sujet exposé ou sans issue.

Le processus de stratification implique une catégorisation des variables. Ceci est intéressant pour illustrer le fait mais ignore que certaines variables peuvent être mieux mesurées d'une manière continue. Ceci mène au concept de confusion résiduelle.

Le processus ayant pour objectif de contrôler l'influence d'une variable confondante peut être incomplet dans la mesure où cette variable n'a pas été catégorisée ou modélisée d'une manière à ce qu'elle capture complètement la nature de sa relation avec la maladie ou avec l'exposition. Aussi, une variable peut ne pas avoir été mesurée assez précisément pour quantifier son effet. En général, toutefois, des erreurs de mesures non différentielles d'une variable confondante peuvent mener à une mesure plus près de l'effet nul. On peut donc penser que l'association réelle sera généralement identique ou plus grande que celle qui est mesurée en ce qui a trait à la variable de confusion.

2. Méthodes et Résultats : articles scientifiques

Comme le format de la thèse est de type par articles scientifiques, les résultats principaux seront présentés sous forme d'article scientifique original. Certains d'entre eux ont été publiés; d'autres sont soumis pour évaluation scientifique par des pairs dans des journaux d'oncologie respectés. Nous vous les présentons ici en séquence.

a) Effet des acides gras oméga-3 de source diététique sur le risque du cancer de la prostate agressif : interaction avec la variation génétique *COX-2*. La première étude porte sur l'effet des sous-types de lipides—avec une emphase sur les acides gras oméga-3—sur l'incidence du cancer de la prostate agressif et la modification de cet effet en fonction du génotype du gène *COX2*, un des gènes les plus importants dans le métabolisme des acides gras de type oméga-3. Le devis de l'étude est de type cas-témoins.

b) Effet des statines sur l'évolution du cancer de la vessie : une étude basée sur des données populationnelles. La seconde étude porte sur l'effet des statines sur l'évolution du cancer superficiel de la vessie après traitement initial par résection trans-urétrale de cette tumeur vésicale. Le devis d'étude est de type cohorte rétrospective.

c) L'importance du temps immortel dans les études rétrospective en cancer : l'exemple des statines en cancer de la vessie. La troisième étude, axée sur le développement méthodologique nécessaire à la recherche épidémiologique de qualité, illustre l'importance du biais du temps immortel dans les devis d'études pharmaco-épidémiologiques rétrospectifs. Les concepts sont illustrés avec les données administratives de la seconde étude, portant sur l'effet des statines sur l'évolution du cancer de la vessie. Nous dressons un éventail exhaustif des méthodes qui permettent de contrôler ce biais et proposons une solution novatrice pour y arriver.

2.1. L'effet des acides gras oméga-3 de source diététique sur le risque du cancer de la prostate agressif : interaction avec la variation génétique *COX-2*

Cet article original intitulé « Dietary Omega-3 Fatty Acids, *COX-2* Genetic Variation, and Aggressive Prostate Cancer Risk » a été publié en 2009 dans la revue *Clinical Cancer Research*.³⁴⁹

Étant l'auteur principal de cet article, j'ai fait ou dirigé moi-même l'ensemble des efforts menant au manuscrit final, en incluant la conception de l'étude, la compilation des données, leur analyse ainsi que la rédaction du manuscrit. Évidemment, ce travail en est un de collaboration, où les différents mentors de ce projet ont assuré une supervision étroite et instructive. Ce projet, s'insérant dans une perspective plus globale de mon projet de formation en sciences biomédicales, a été aussi supervisé par mon directeur de recherche.

**Dietary Omega-3 Fatty Acids, *COX-2* Genetic Variation, and
Aggressive Prostate Cancer Risk**

Vincent Fradet^{1,3}, Iona Cheng^{2,3}, Graham Casey⁴, John S. Witte¹⁻³

Departments of ¹ Urology and of ² Epidemiology and Biostatistics, and ³ Institute for Human Genetics, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, 94143-0794, USA

⁴ Department of Preventive Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Address for correspondence:

John S. Witte

Department of Epidemiology and Biostatistics

University of California, San Francisco

San Francisco, CA 94143-0794, USA

Tel: 415-476-1127

Fax: 415-476-1356

Keywords: prostatic neoplasms, diet, omega-3 fatty acids, cyclooxygenase 2, genetic variation

Word Count of Abstract: 250

Word Count of Text: 3383

(excluding abstract, table legends and references)

Number of Tables: 5

Number of Figures: 0

Financial Support: VF is supported by the McLaughlin dean's grant from Laval University. IC is supported by National Institute of Health R25T training grant (CA112355). This work was supported by the National Institute of Health grants (CA88164, CA94211, and CA98683).

STATEMENT OF TRANSLATIONAL RELEVANCE.

By aiming to understanding the clinical and mechanistic effect of modifiable risk factors—dietary fatty acids—on the most commonly diagnosed cancer in men, this topic is of high relevance to the scientific community. In fact, our findings suggest that by consuming high amount of long chain fatty acids – mainly dark fish and shellfish – men can lower their risk of prostate cancer. Importantly, this protective effect is even stronger in men carrying a *COX-2* gene variant (rs4648310) that is a risk factor for prostate cancer, or is independent of genetic variation at other *COX-2* single nucleotide polymorphisms. *COX-2* is the main enzyme involved in the metabolism of fatty acids and plays a key role in chronic inflammation that may lead to prostate carcinogenesis. Genetic variation of *COX-2* is associated with prostate cancer. Our findings suggest that the dietary recommendation may be appropriate for all men, independently of their genetic background.

ABSTRACT

Purpose: Dietary intake of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3) may reduce inflammation and in turn decrease risk of prostate cancer development and progression. This potential effect may be modified by genetic variation in *COX-2*, a key enzyme in fatty acid metabolism and inflammation.

Experimental Design: We used a case-control study of 466 men diagnosed with aggressive prostate cancer and 478 age- and ethnicity-matched controls. Diet was assessed with a semi-quantitative food frequency questionnaire, and nine *COX-2* tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped. We used logistic regression models to estimate odds ratios (ORs), 95% confidence intervals (CIs), and p-values for association and interaction.

Results: Increasing intake of LC n-3 was strongly associated with a decreased risk of aggressive prostate cancer (trend $p \leq 0.0001$). The OR (95% CI) for prostate cancer comparing the highest to the lowest quartile of omega-3 intake was of 0.37 (0.25 – 0.54). The LC n-3 association was modified by the rs4648310 *COX-2* SNP (interaction $p=0.02$). In particular, the inverse association was even stronger among men with this variant SNP. This reflected the observation that men with low LC n-3 intake and the variant rs4648310 SNP had an increased risk of disease (OR = 5.49; 95% CI: 1.80-16.7), which was reversed by increasing intake of LC n-3.

Conclusions: Dietary LC n-3 PUFAs appear protective for aggressive prostate cancer, and this effect is modified by the *COX-2* SNP rs4648310. Our findings support the hypothesis that LC n-3 may impact prostate inflammation and carcinogenesis through the COX-2 enzymatic pathway.

INTRODUCTION

Prostate cancer is one of the most common cancers in men⁴¹⁰ and in 2008 is projected to account for almost 30% of the new cancer diagnoses in the U.S.⁴¹¹ Identifying risk factors for prostate cancer is critically important to develop potential interventions and to expand our understanding of the biology of this disease. Increasing evidence supports the existence of risk factors involved with inflammation; pro-inflammatory mediators within the prostate can lead to a state of chronic inflammation resulting in lesions of proliferative inflammatory atrophy that may transition to prostatic intraepithelial neoplasia and eventually prostate adenocarcinoma.²⁹⁹

Several sources of inflammation may influence the risk of prostate cancer, including diet,⁸⁷ bacterial^{59, 88} and viral⁸⁹ infections, and intraprostatic urine reflux.^{91, 92} With regard to diet, a number of nutritional factors may reduce the risk and progression of prostate cancer through anti-oxidant and anti-inflammatory effects.⁸⁷ These include omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs), fish, selenium, vitamins D and E, and lycopene.⁸⁷

PUFAs are classified according to their molecular configuration: omega-6 (n-6) or omega-3 (n-3). The n-6 PUFAs, such as linoleic acid (LA) and arachidonic acid (AA), are metabolized into pro-inflammatory eicosanoids, including prostaglandin E₂—which has been linked to carcinogenesis in studies of prostate and other tumors.^{300, 301} In contrast, the n-3 PUFAs, such as α -linolenic acid (ALA) 18:3, eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5, docosahexaenoic acid (DHA) 22:6 and docosapentaenoic acid (DPA) 22:5 exhibit anti-inflammatory properties by inhibiting the enzymatic activity of Δ -6 desaturase and COX enzymes,³⁰² thus reducing the production of pro-inflammatory prostaglandins derived from arachidonic acid. Long chain n-3 PUFAs (LC n-3), EPA, DPA and DHA, appear the most potent at this enzyme inhibition. The main sources of LC n-3 in the typical ‘Western diet’ are dark fish and shellfish.

Multiple lines of evidence suggest that polyunsaturated acids (PUFAs) play a role in prostate carcinogenesis. In animal studies, mice fed an n-3 versus an n-6 PUFA diet exhibit a decreased expression of COX-2 in their implanted prostate tumors as well as a decreased rate of prostate cancer tumor recurrence after excision (mimicking radical prostatectomy).³¹³ Mice fed an EPA-rich diet have higher LC n-3 content in their implanted prostate tumor and a better response to hormone ablation.³¹⁶ In humans, three months of a low-fat, fish oil supplemented diet decreased COX-2 expression in prostatic tissue in four of seven men with untreated prostate cancer.³¹²

Some, though not all, epidemiological studies of fish and/or n-3 PUFA intake and prostate cancer have observed inverse associations.^{319-321, 323, 324, 330, 331, 340, 412-414} Of seven prospective studies of fish intake and prostate cancer risk, three reported an inverse association with high intake of fish,^{319, 320, 414} one reported a positive association,³³⁰ while four were equivocal.^{321, 323, 412, 413} Similarly, some prospective studies of LC n-3, EPA, DPA or DHA and prostate cancer have detected inverse associations with increased intake,^{319, 323, 324} although another study found a positive association,³⁴² and three other studies observed no association.^{321, 341, 350} These somewhat inconsistent findings might reflect the heterogeneity of prostate cancer; in fact, the potential protective effect of fish and LC n-3 appears strongest for aggressive and metastatic disease, and for death caused by prostate cancer.^{319, 320, 414} Note also that ALA and total n-6 PUFA intake have been associated with increased risk of prostate cancer.^{301, 415, 416}

Another possible explanation for the slightly equivocal inverse associations observed for n-3 PUFAs is effect modification by genotype. A recent study of Swedish men found that frequent consumption of fatty fish—a proxy for long-chain n-3 PUFAs—was inversely associated with prostate cancer risk (OR= 0.57; 95% CI: 0.43-0.76); moreover, this effect was modified by the rs5275 single nucleotide polymorphism (SNP) in COX-2, whereby only men carrying the variant allele maintained a strong inverse association between fatty fish intake and prostate cancer.³²⁹ This suggests that the potential protective effect of long-chain PUFAs on prostate cancer may be modified by COX-2.

In light of these findings, and the potential stronger protective effect of LC n-3 and dark fish on aggressive disease, we investigate here the influence of n-3 PUFAs and dark fish on risk of aggressive prostate cancer. Furthermore, we examine whether such associations are modified by *COX-2* variants.

METHODS

Study Subjects

Between 2001 and 2004, we recruited 506 aggressive incident prostate cancer cases and 506 controls from the major medical institutions in Cleveland, Ohio (The Cleveland Clinic, University Hospitals of Cleveland, and their affiliates). Aggressive prostate cancer cases were confirmed histologically and defined as having a Gleason score ≥ 7 , TNM stage \geq T2c, or PSA at diagnosis >10 ng/ml. Cases were contacted shortly following diagnosis with a median time between diagnosis and recruitment of 4.7 months. To help ensure that the controls were representative of the source population of the cases, controls were men who underwent standard annual medical exams at the collaborating medical institutions. Controls had no diagnosis of prostate cancer or any other non-skin cancer. At study entry, all controls were screened with a serum PSA test. If their PSA value was higher than 4.0 ng/mL, patients underwent a formal prostate cancer evaluation and biopsy. Follow-up on the 50 patients having PSA > 4 ng/mL led to the diagnosis of 2 new prostate cancer cases. Both patients met our criteria for aggressive disease and were subsequently included as cases in our study. Controls were frequency matched to cases by age (within 5 years), ethnicity, and medical institution. Data was collected on various clinical, anthropometric and demographic factors during an in-person computer-aided interview.

Institutional Review Board approval was obtained from the participating medical institutions. Informed consent was obtained from all study participants.

Nutritional assessment

Nutrient data was collected using a validated food frequency questionnaire developed by the Nutrition Assessment Shared Resource (NASR) of the Fred Hutchinson Cancer Research Center. Nutrient calculations were performed using the Nutrient Data System for Research (NDSR) software version 2007 developed by the Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN (Food and Nutrient Database version 2007).⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ For these analyses, we excluded 68 subjects because of implausible values for total calorie intake (<500 kcal/day or >5000 kcal/day).³²⁹

COX-2 tag SNP selection

We previously reported detailed methods of SNP selection and genotyping of *COX-2* in our study.¹¹⁴ Briefly, we evaluated the genetic structure of *COX-2* using information from the International HapMap project,⁴²⁰ Perlegen, and the Seattle SNP projects (National Heart, Lung, and Blood Institute Genome Variation Server; <http://gvs.gs.washington.edu/GVS/>). We identified seven tag SNPs that could be successfully genotyped and two other common *COX-2* SNPs, +8365 C/T (rs689470) and -899 G/C (rs20417) that were previously associated with prostate cancer.^{112, 113} These nine SNPs were genotyped in our case-control population: rs689466, rs20417, rs2745557, rs5277, rs2066826, rs5275, rs2206593, rs689470 and rs4648310.

Statistical analysis

We examined the association between dietary intake of PUFAs, fish, and aggressive prostate cancer using unconditional logistic regression models. We evaluated the main effects of individual n-6 PUFAs (i.e., LA and AA; grams/day) and n-3 PUFAs and total LC n-3 (i.e., EPA, DHA, DPA; grams/day). All PUFAs were categorized into quartiles based on their distribution among controls. We also examined the intake of the following fish:

dark fish (such as salmon, mackerel, and bluefish; boiled or baked), white fish (such as sole, halibut, snapper and cod; boiled or baked), shellfish (i.e. shrimp, lobster and oysters; not fried), tuna (i.e. canned tuna, tuna salad and tuna casserole), and fried fish (i.e. fried fish, fish sandwich and fried shellfish). Fish intake variables (except shellfish) were categorized into never, 1-3 times per month, and once or more per week. Because of lower intake, shellfish intake was categorized in never, once per month, and twice or more per month. The trend p-values were calculated with the PUFA/fish variable modeled continuously.

To investigate potential modification of the PUFAs effects by *COX-2* genotypes, we focused on overall LC n-3 consumption and the five SNPs with statistically significant associations with prostate cancer, using dominant or recessive coding as previously reported.¹¹⁴ Here, we first stratified the logistic regression analyses of LC n-3 (continuous) by *COX-2* genotypes. Then we extended the unconditional logistic regression model to include LC n-3 PUFAs, *COX-2* genotype, and their interaction.

All logistic regression models adjusted for the matching variables – age, ethnicity and institution – and total calorie intake. To evaluate potential confounding due to lifestyle factors associated with healthy behavior and prostate screening, we examined the following covariates: smoking (pack years), BMI (kg/m^2), prior history of PSA testing for prostate cancer (never/once/twice or more), and family history of prostate cancer (two or more first-degree relative per family, or one first-degree and two or more second-degree relatives). None of these covariates materially influenced the main-effect logistic regression coefficients (i.e., always resulting in a less than 10% change in the regression coefficients), and are thus excluded from our final models. All p-values are two-sided, and all analyses were undertaken with SAS software (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina).

RESULTS

Table 2. Characteristics of prostate cancer cases and controls in study of aggressive disease.

		Cases (n=466)		Controls (n=478)	
Age, y	Mean +/- SD	65.5	+/- 8.1	65.7	+/- 8.2
Ethnicity: n (%)					
	African American	76	(16.3)	81	(17.0)
	Caucasian	390	(83.7)	397	(83.0)
Family history of prostate cancer: n (%)					
	Negative	438	(94.0)	473	(98.9)
	Positive*	28	(6.0)	5	(1.1)
Smoking [†] (pack years): n (%)					
	Never	194	(41.7)	189	(39.9)
	10 or less	88	(18.9)	90	(19.0)
	10 – 20	51	(11.0)	62	(13.1)
	20 – 40	85	(18.3)	81	(17.1)
	40 or more	47	(10.1)	52	(10.9)
Body Mass Index (kg/m ²)	Mean +/- SD	27.7	+/- 4.6	27.9	+/- 4.7
Prior history of PSA test [†] : n (%)					
	Never	99	(22.3)	104	(23.9)
	Once	54	(12.1)	66	(15.2)
	Twice or more	292	(65.6)	265	(60.9)
Serum PSA value (ng/mL)	Mean +/- SD	13.5	+/- 23.3	1.7	+/- 1.7
Clinical stage [†] : n (%)					
	T1c	285	(64.0)		
	any T2	133	(29.9)		
	T3	27	(6.1)		
Histologic tumor grade: Gleason score: n (%)					
	6 or less	75	(16.1)		
	7	287	(61.6)		
	8 or more	104	(22.3)		

* Family history of prostate cancer was defined as two or more first-degree relative per family, or one first-degree and two or more second-degree relatives.

[†] Numbers do not always add to 100% because of missing data.

The demographic and clinical characteristics of the study subjects are presented in Table 2. Cases reported a higher frequency of family history of prostate cancer and previous history of PSA testing than controls. The average PSA at diagnosis for cases was 13.4 ng/mL and 84% of the cases had a Gleason score ≥ 7 . Mean dietary intake of total calories, fat, and LA was statistically significantly higher in cases than controls (Table 3). In contrast, mean intake of EPA, DHA, and DPA was significantly lower in cases than controls. In addition, the mean intake of dark fish and shellfish was significantly lower in cases than in controls (Table 3).

Table 3. Average intake of calories, total fat, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and fish in study population, stratified by prostate cancer status.

Dietary Factor	Cases (N=466)		Controls (N=478)		p-value*
	Mean	SD	Mean	SD	
Total Calories (kcal / day)	2282	871	2098	785	0.0007
Total Fat (g / day)	87.5	43.9	78.8	39.5	0.001
Polyunsaturated Fatty Acids					
Omega-6 PUFAs (g / day)					
Linoleic acid [LA] 18:2	16.8	8.60	15.3	7.92	0.007
Arachidonic acid [AA] 20:4	0.175	0.112	0.166	0.090	0.20
Omega-3 PUFAs (g / day)					
Alpha-Linolenic acid [ALA] 18:3	1.73	0.90	1.64	0.83	0.10
Eicosapentaenoic acid [EPA] 20:5	0.072	0.078	0.089	0.075	0.0007
Docosapentaenoic acid [DPA] 22:5	0.027	0.028	0.033	0.027	0.0008
Docosaheptaenoic acid [DHA] 22:6	0.147	0.169	0.186	0.175	0.0005
Long-Chain Omega-3 PUFAs [†]	0.247	0.270	0.309	0.273	0.0005
Fish (servings / month)					
Dark fish [‡]	1.11	1.98	1.74	2.64	<0.0001
Whitefish [§]	1.72	3.67	1.93	2.58	0.31
Shellfish	0.57	0.98	0.88	1.48	0.0002
Tuna [¶]	2.02	3.09	2.35	3.64	0.14
Fried Fish ^{**}	1.43	1.94	1.63	2.17	0.15

* p-values obtained from t-tests comparing mean values between cases and controls.

[†] Eicosapentaenoic acid + Docosapentaenoic acid + Docosaheptaenoic acid.

[‡] Salmon, mackerel and bluefish (broiled or baked).

[§] Sole, halibut, snapper and cod (broiled or baked).

^{||} Shrimp, lobster, crab and oysters (not fried).

[¶] Canned tuna, tuna salad and tuna casserole.

^{**} Fried fish, fish sandwich and fried shellfish (shrimp and oysters).

The associations between dietary PUFAs and aggressive prostate cancer are presented in Table 4. Higher intake of any and total LC n-3s were significantly associated with a strong dose-response reduction in prostate cancer risk (p for trend ≤ 0.0001). For EPA, the adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) for the second, third, and fourth quartiles in comparison to the first were 0.60 (95% CI: 0.42 – 0.86), 0.50 (95% CI: 0.35 – 0.71), and 0.35 (95% CI: 0.24 – 0.52), respectively. For DPA, the ORs and 95% CIs across low to high quartiles of intake were 0.71 (95% CI: 0.50 – 1.01), 0.45 (95% CI: 0.31 – 0.66), and 0.40 (95% CI: 0.27 – 0.59). For DHA, similar effects were also observed : 0.60 (95% CI: 0.40 – 0.86), 0.45 (95% CI: 0.31 – 0.65), and 0.36 (95% CI: 0.25 – 0.53). EPA was positively correlated with DPA and DHA (both $r = 0.93$); DPA was correlated with DHA ($r = 0.96$). The associations observed were consistent across ethnic group (african american or caucasian; data not shown). We observed no significant association between ALA or total n-6 PUFA, and aggressive prostate cancer (Table 4).

Table 4. Association between dietary polyunsaturated fatty acids and aggressive prostate cancer

	Quartile of PUFA Intake				
Polyunsaturated Fatty Acid	1 (reference)	2	3	4	P-trend*
Omega-6 PUFAs					
Linoleic Acid (LA) 18:2					
Level [†] (g)	7.53	11.73	16.19	24.22	
Cases / controls	104 / 120	91 / 119	116 / 120	115 / 119	
		0.78	0.88	0.97	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.52 – 1.16)	(0.57 – 1.35)	(0.56 – 1.67)	0.84
Arachidonic Acid (AA) 20:4					
Level [†] (g)	0.075	0.126	0.177	0.280	
Cases / controls	111 / 119	135 / 120	105 / 120	115 / 119	
		1.00	0.64	0.59	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.69 – 1.44)	(0.43 - 0.97)	(0.38 – 0.93)	0.37
Omega-3 PUFAs					
α -Linolenic Acid 18:3 (ALA) 18:3					
Level [†] (g)	0.79	1.27	1.75	2.55	
Cases / controls	108 / 120	106 / 119	103 / 120	149 / 119	
		0.83	0.71	0.81	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.56 - 1.23)	(0.46 - 1.09)	(0.48 – 1.35)	0.11
Eicosapentaenoic acid (EPA) 20:5					
Level [†] (g)	0.020	0.051	0.090	0.167	
Cases / controls	176 / 119	113 / 120	103 / 120	74 / 119	
		0.60	0.50	0.35	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.42 - 0.86)	(0.35 - 0.71)	(0.24 - 0.52)	<0.0001
Docosapentaenoic acid (DPA) 22:5					
Level [†] (g)	0.008	0.020	0.034	0.061	
Cases / controls	164 / 120	131 / 119	89 / 120	82 / 119	
		0.71	0.45	0.40	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.50 – 1.01)	(0.31 - 0.66)	(0.27 - 0.59)	<0.0001
Docosahexaenoic acid (DHA) 22:6					
Level [†] (g)	0.037	0.097	0.180	0.368	
Cases / controls	175 / 120	112 / 119	92 / 120	77 / 119	
		0.60	0.45	0.36	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.42 – 0.86)	(0.31 - 0.65)	(0.25 - 0.53)	<0.0001
Long Chain Omega-3 PUFAs [§]					
Level [†] (g)	0.067	0.167	0.297	0.588	
Cases / controls	173 / 120	119 / 119	95 / 119	79 / 120	
		0.61	0.47	0.37	
Adjusted OR [‡]	1.0	(0.43 – 0.87)	(0.32 – 0.68)	(0.25 – 0.54)	<0.0001

* Calculated with actual values as a continuous variable. [†] Mid-point of quartile. [‡] Adjusted for calories, age, ethnicity, and institution, N=944. Adjustment for total fat intake, BMI, smoking, PSA screening, and family history of prostate cancer did not materially affect the results.

[§] Eicosapentaenoic acid + Docosapentaenoic acid + Docosahexaenoic acid.

PUFAs= Polyunsaturated Fatty Acids

Table 5. Association between dietary fish intake and aggressive prostate cancer

	Frequency			
Fish	Never (reference)	1-3/month	≥ 1 / week	P-trend*
Dark Fish [‡]				
Cases / controls	271 / 213	145 / 175	50 / 90	
Adjusted OR [†]	1.0	0.64 (0.48 – 0.86)	0.43 (0.29 – 0.63)	<0.0001
White Fish [§]				
Cases / controls	192 / 165	205 / 225	69 / 88	
Adjusted OR [†]	1.0	0.77 (0.58 – 1.03)	0.66 (0.45 – 0.96)	0.32
Shellfish				
Cases / controls	296 / 265	112 : 120	58 / 93	
Adjusted OR [†]	1.0	0.81 (0.59 – 1.11)	0.51 (0.35 – 0.74)	<0.0001
Tuna [¶]				
Cases / controls	158 / 153	227 / 229	81 / 96	
Adjusted OR [†]	1.0	0.92 (0.69 – 1.24)	0.75 (0.51 – 1.09)	0.04
Fried Fish**				
Cases / controls	186 / 194	223 / 198	57 / 86	
Adjusted OR [†]	1.0	1.10 (0.83 – 1.47)	0.56 (0.37 – 0.86)	0.03

* Calculated with actual values as a continuous variable.

[†] Adjusted for calories, age, ethnicity, and institution, N=944. Adjustment for total fat intake, BMI, smoking, PSA screening, and family history of prostate cancer did not materially alter our results.

[‡] Salmon, mackerel and bluefish (broiled or baked).

[§] Sole, halibut, snapper and cod (broiled or baked).

^{||} Shrimp, lobster, crab and oysters (not fried). Actual categories are never, once per month and twice or more per month.

[¶] Canned tuna, tuna salad and tuna casserole.

^{**} Fried fish, fish sandwich and fried shellfish (shrimp and oysters).

Table 6. Association between long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and aggressive prostate cancer, stratified by *COX-2* genotypes.

			Long Chain Omega-3 PUFA*						
			Cases / controls Quartile of Intake						
rs number	COX-2 SNP Genotype	OR [†] (95% CI)	1	2	3	4	OR [‡] (95% CI)	P-trend [‡]	P-Interaction [§]
All subjects			173 / 120	119 / 119	95 / 119	79 / 120	0.61 (0.46-0.81)		
rs2745557	GG	1.0	125 / 77	87 / 70	67 / 79	58 / 75	0.59 (0.42-0.83)	0.002	0.72
	GA or AA	0.65 (0.49-0.86)	48 / 43	32 / 49	28 / 40	21 / 45	0.51 (0.32-0.84)	0.007	
rs5277	CC	1.0	122 / 84	84 / 98	66 / 93	54 / 90	0.60 (0.44-0.82)	0.001	0.75
	CG or GG	1.38 (1.03-1.86)	51 / 36	34 / 21	29 / 26	25 / 30	0.48 (0.27-0.85)	0.012	
rs2206593	CC	1.0	161 / 108	110 / 103	88 / 97	71 / 104	0.53 (0.39-0.71)	<0.0001	0.14
	CT or TT	0.53 (0.34-0.81)	12 / 11	9 / 16	7 / 22	8 / 16	0.96 (0.47-1.95)	0.91	
rs689470	GG or GA	1.0	167 / 117	113 / 116	90 / 114	73 / 118	0.56 (0.43-0.75)	<0.0001	0.98
	AA	2.23 (1.03-4.87)	6 / 2	5 / 3	5 / 5	6 / 2	0.16 (0.01-2.01)	0.15	
rs4648310	AA	1.0	158 / 118	111 / 116	89 / 113	76 / 113	0.61 (0.47-0.81)	0.0006	0.02
	AG or GG	1.88 (1.04-3.40)	15 / 2	8 / 3	6 / 6	3 / 7	0.07 (0.01-0.41)	0.003	

* Eicosapentaenoic acid + Docosapentaenoic acid + Docosahexaenoic acid.

[†] For main genetic effect (ignoring PUFA intake). Adjusted for age, ethnicity and institution.

[‡] Stratified by genotypes. From logistic model, with long chain omega-3 PUFAs as a continuous variable. ORs correspond to difference between median values of quartiles 1 and 4 (0.52 g/day) unit increase in PUFAs. Adjusted for total calorie intake, age, ethnicity and institution.

[§] Multiplicative interaction from cross-product term in logistic regression between PUFAs (continuous) and each *COX-2* SNP.

The associations between fish types and aggressive prostate cancer risk are shown in Table 5. Higher intake of dark fish was associated with a significantly decreased risk of prostate cancer. Men who ate dark fish 1-3 times per month had a 36% lower risk of prostate cancer in comparison to men who never ate dark fish (OR = 0.64; 95% CI: 0.48-0.86). Furthermore, those who ate dark fish more than once per week had an even larger reduction in risk in comparison to those who never ate dark fish (OR = 0.43; 95% CI: 0.29-0.63). A similar dose-response reduction in risk of aggressive prostate cancer was found for shellfish intake (both p trend <0.0001). Such an association pattern or significance level was not observed with other fish types (Table 5).

Results from the LC n-3 analyses stratified by *COX-2* genotypes are given in Table 6. The main effects for the five nominally significant SNPs are listed first, followed by the stratified case / control counts and total LC n-3 associations. Stratification by most of the SNPs did not materially alter the LC n-3 associations (Table 6). However, the inverse association between LC n-3 and aggressive prostate cancer was even stronger among men with the variant (AG or GG) rs4648310 genotype (Table 6). This reflects the larger variation in case-control counts across quartiles of LC n-3 intake among men with the variant genotype: in the lowest quartile there are substantially more cases than controls, whereas the opposite is observed in the highest quartile (Table 6).

This difference was also supported by the interaction models, which gave a nominally significant interaction between LC n-3 and the rs4648310 SNP in *COX-2* (p = 0.02). Among men with the rs4648310 wildtype (AA), increasing LC n-3 consumption by a half-gram per day was inversely associated with prostate cancer at a similar level as suggested from the overall main effects for LC n-3 (OR = 0.61; 95% CI: 0.46-0.81). However, for men with the rs4648310 variant, low consumption of LC n-3 PUFAs resulted in an increased risk of aggressive prostate cancer (OR = 5.49; 95% CI: 1.80-16.7). This positive association was essentially reversed with increasing consumption of LC n-3 by a half-gram per day, although the small number of cases with the variant and high intake of LC n-3 led to wide confidence intervals (OR = 0.42; 95% CI: 0.13-1.37).

DISCUSSION

We detected strong inverse associations between increasing intake of long-chain omega-3 PUFAs EPA, DPA and DHA and aggressive prostate cancer. The decreased risk followed a clear dose-response pattern across increasing levels of LC n-3 intake, whereby men in the highest quartile of consumption had less than half the risk of aggressive disease in comparison to men in the lowest quartile. In addition, this inverse association was modified by the *COX-2* SNP rs4648310, and men with the variant genotype (AG or GG) and low intake of LC n-3 had a much higher risk than men with the variant genotype but a high intake of LC n-3.

Our findings for the main effects of PUFAs are consistent with previous reports. Despite mixed results for overall prostate cancer, LC n-3 appears to be more strongly associated with more aggressive prostate cancers. The Health Professionals Follow-Up Study found a weak inverse association between high fish consumption—and high LC n-3 consumption—and prostate cancer risk. The association was stronger and statistically significant only for metastatic prostate cancer (OR = 0.56, 95% CI: 0.37 – 0.86).³¹⁹ A study from the Swedish twin registry³²⁰ found that individuals with a high fish intake had a two-fold decrease in risk of prostate cancer and a three-fold decrease in death from prostate cancer. In another Swedish study,³²⁹ high fatty fish consumption was associated with a 2-fold decrease in prostate cancer risk. This effect estimate was stable across disease stages, but the study population was composed of an advanced cancer sample: primarily men unscreened for prostate cancer with 41% having metastatic disease.

These results—and or observations—suggest that LC n-3 may have a more pronounced effect on biologically aggressive tumors or on their progression, and less on carcinogenesis of more benign or earlier stage tumors often detected by screening.^{421, 422} This appears to be true across varying baseline population levels of fish and LC n-3 intake. The fish/LC n-3 levels of the Health Professionals Follow-Up Study^{319, 324} are similar to that of our study, while those of the Swedish^{320, 329, 342} and Japanese³³⁰ studies were much higher, and those of the Dutch studies^{321, 340}, lower, with a narrow range of variation making association patterns more difficult to isolate.

In most of the studies reporting no association, PUFAs or fish were measured only once in the 1980s or early 1990s and the fish type was not differentiated,^{323, 340, 412, 413} or the different PUFAs were not distinguished but rather evaluated overall.^{321, 341, 350} This might explain the absence of association. Moreover, two of the negative studies were on cohorts with short follow-up, which might be problematic for prostate cancer since it is a relatively latent disease generally occurring later in life.^{331, 413}

Two studies reported a positive association between LC n-3/fish intake and prostate cancer, although they were both undertaken in populations with much higher fish intake than our study—Sweden³⁴² and Japan³³⁰—and they did not differentiate type of fish consumed. As noted by the authors of these studies, the positive association could be confounded by environmental toxins such as polychlorinated biphenyls (PCBs) or methylmercury compounds contained in fish. In the Japanese study,³³⁰ the exposure was defined in the 1960s and 1970s with follow-up until late 1990s, during which dietary patterns have changed,⁴²³ resulting in another source of potential confounding. Prospective studies where exposure is reassessed periodically, such as the Health Professional Follow-up Study,^{319, 324} provide better measures of adult dietary intake and have shown negative associations.

Our findings of an interaction between LC n-3 and the *COX-2* SNP rs4648310 suggest that while carriers of the variant SNP had an overall increased risk of aggressive prostate cancer, this deleterious effect was found only in men consuming low levels of LC n-3. Moreover, this association was reversed by high consumption of LC n-3. The diet x rs4648310 interaction was similar across individual LC n-3 (EPA, DPA and DHA) and dark fish (interaction $p = 0.002$, data not shown)—the main source of the PUFAs.

These results are in general agreement with those previously reported in a Swedish study³²⁹. Although rs4648310 was not genotyped in their study, they found that another *COX-2* SNP (rs5275) modified the impact of fish intake on prostate cancer (p interaction < 0.01). In particular, Salmon-type fish consumption—a proxy for LC n-3 intake—was protective only among men carrying the variant rs5275 genotypes (p trend < 0.01). We did not observe a similar pattern of interaction with rs5275 in our study (p interaction = 0.8).

SNPs rs4648310 and rs5275 are located 2.4 kilobases apart and exhibit weak linkage disequilibrium in our population ($r^2=0.01$, among whites). The functional impact of rs4648310 and rs5275, both intronic variants, on COX-2 activity is not yet known. It is possible that either of these polymorphisms, or another linked variant, may have biological effects on COX-2 activity. Collectively, the combined findings of our study and that of the Swedish population support the overall hypothesis that LC n-3 modifies prostate inflammation through the *COX-2* enzymatic pathway.

There are a number of potential limitations to our study that merit consideration. By using a case-control design, we cannot completely exclude recall bias. Yet, when subjects were recruited into this study, there was little information to suggest that food elements rich in LC n-3 were protective against prostate cancer. In addition, cases were recruited into the study shortly following diagnosis, and asked to recall their dietary intake in the time period prior to diagnosis. Therefore, a differential recall of food intake between cases and controls explaining the observed association appears unlikely.

Selection bias cannot be completely ignored in our study since we have excluded 68 cases because of implausible (extremely high) calorie intake. Since this is standard practice in nutritional epidemiology, with a goal of increasing internal study validity, we have not measured the association measures with those cases kept in the cohort. It is unclear how these exclusions may have biased the association measures.

Prognostic selection bias in our study cannot be completely excluded since a majority of our cases were diagnosed by screening³⁹⁷. Screening, a health-conscious behavior, may be associated with the consumption of a healthier diet, fish, and LC n-3 FA. We attempted to address this issue by adjusting for variables associated with health-seeking behaviors: smoking, BMI, previous prostate cancer screening with PSA, and total dietary fat intake.⁴¹⁵ Controlling for these factors did not materially modify our findings. In addition, we required that our controls also be PSA screened. Another group has previously reported that adjusting for PSA screening did not affect the association of n-3 FA and aggressive prostate cancer³¹⁹. In addition, any potential confounding due to the cases

having less healthy behaviors than controls is unlikely to explain the relatively large protective effect of n-3 FA we observed.

In summary, our study demonstrates that the dietary long-chain omega-3 fatty acids (LC n-3), EPA, DPA and DHA, are inversely associated with aggressive prostate cancer. This potential protective effect may be modified by genetic variation in *COX-2*, whereby the deleterious effect of one SNP (rs4648310) was reversed by the LC n-3 effect. Furthermore, our study provides additional support for the role of inflammation in prostate cancer susceptibility and progression. More clinical and biological studies are needed to decipher how dietary long-chain omega-3 fatty acids and other factors involved with inflammation such as *COX-2* genotypes affect aggressive prostate cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the participants of this study, who have contributed to a better understanding of the genetic contributions to prostate cancer susceptibility. VF is supported by the McLaughlin dean's grant from Laval University. IC is supported by National Institute of Health R25T training grant (CA112355). This work was supported by the National Institute of Health grants (CA88164, CA94211, and CA98683).

2.2. L'effet des statines sur l'évolution du cancer superficiel de la vessie

Cet deuxième article scientifique original faisant partie de la présente thèse est intitulé « Effect of statins on bladder cancer evolution : a population-based cohort study ». Le manuscript a été soumis à la revue *Journal of The National Cancer Institute*, qui a récemment publié des études portant sur l'effet potentiel anti-cancer des statines et basées sur des données populationnelles.

Étant l'auteur principal de cet article, j'ai fait ou dirigé moi-même l'ensemble des efforts menant au manuscript final, en incluant la conception de l'étude, la compilation des données, leur analyse ainsi que la rédaction du manuscript. Évidemment, ce travail en est un de collaboration, où les différents mentors de ce projet ont assuré une supervision étroite et instructive.

Statin drugs and bladder cancer evolution : a population-based cohort study

Vincent Fradet^{1,2,3}, Jacques Leloirier^{3,4}, Odile Sheehy³, André Caron², Thierry Duchesne^{5,6}, Fred Saad^{3,7}

Author affiliations:

¹ Department of Surgery/Urology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada;

² Laval University Cancer Research Center, CHUQ – Hôtel-Dieu de Quebec, Quebec, Canada;

³ CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Canada

⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada;

⁵ Faculty of Mathematics and Biostatistics, Laval University, Quebec, Canada;

⁶ Population health unit (URESP), Centre de recherche FRQS du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec, Québec, Canada

⁷ Department of Surgery/Urology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada;

Address correspondence to:

Vincent Fradet, MD, FRCSC (urology)

Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval

CHUQ – Hôtel-Dieu de Québec

11 côte du Palais

Quebec, Quebec, G1R 2J6, Canada

Fax: +1 (418) 691-5562

Key words : bladder cancer, statins, cancer prevention, pharmacoepidemiology, cohort study, immortal time, cancer outcomes,

Abstract

Objective. Statin drugs may have an anti-cancer effect but their effect on bladder cancer evolution is unknown. Our objective was to describe the effect of statin use on superficial bladder cancer recurrence, progression and mortality from all causes.

Subjects and Methods. We used a retrospective cohort population-based study design using administrative databases from Quebec, Canada. We identified 3,037 patients who had an incident superficial bladder cancer as sole cancer and who had complete drug coverage for one year before index date. Time-dependent Cox proportional hazards regression models were used to estimate the effect of statin use on bladder cancer recurrence, progression and mortality from all causes.

Results. Current use of statin was not associated with bladder cancer recurrence. However, compared to non use, current statin use was inversely associated with progression to muscle-invasive disease necessitating radical cystectomy after additionally adjusting for other potential risk factors for bladder cancer recurrence (HR = 0.38, 95% CI = 0.18 to 0.84, $p=0.0160$). The inverse association was even stronger for risk of mortality from all causes (HR = 0.57, 95% CI = 0.43 to 0.77, $p=0.0001$). The statin use effect appears positively dose-related whereby an increasingly protective effect was seen with an increasing cumulative dose.

Conclusion. Statin use after initial treatment of a superficial bladder cancer tumour was associated with a reduced risk of bladder cancer progression to a more invasive disease and with a reduced risk of death from all causes, whereas no association between statin use and risk of recurrence was observed.

Introduction

Since the discovery of statin drugs in 1970's their use has increased¹⁸¹ dramatically.³⁵⁷ From treatment of the hypercholesterolemia, indications have progressed to secondary prevention, then primary prevention of cardiovascular diseases.^{86, 362, 364} More recently, new potential effects of statins have been measured in various diseases such as dementia^{366, 368}, multiple sclerosis^{370, 371}, rheumatoid arthritis^{372, 373}, and fractures³⁷⁴⁻³⁷⁷.

A growing literature is supporting a potential preventive role of statins against cancer development^{378-380, 382}. Other meta-analysis studies were negative^{383, 424}, supporting the opinion that the meta-analysis study design, pooling trials of cardiovascular diseases where incidence of cancer was not the primary end-point, is inappropriate to evaluate unexpected effects of statins⁴²⁵. Indeed, those trials do not describe well the cancer diagnostic method and how data about incident cancers was collected. Furthermore, other methodological issues are raised. Some suggest that a long latency period may explain the absence of measured associations⁴²⁶, while others suggest that statin effect may be modified by age, whereby older patients may have an increased risk of cancer⁴²⁷.

However, little is known about the effect of statin use on cancer recurrence after initial treatment. Statin use appears to decrease risk of prostate cancer recurrence after radiation therapy⁴²⁸ and after radical prostatectomy⁴²⁹ for prostate cancer. It appears to have similar effects after initial treatment for breast cancer.⁴³⁰ The effect of statin use after treatment for bladder cancer is virtually unknown, although one group found a univariate only significant association between statin use and lower recurrence risk after radiation therapy for muscle invasive bladder cancer.³⁸⁷

Given that statins affect the cancer biology in a manner relevant to cancer prevention^{381, 388, 431}, our objective was thus to describe the effect of statins on superficial

bladder cancer recurrence, progression and mortality from all causes. Our hypothesis was that statins have a protective effect.

Methods

Data Source

We used a retrospective cohort study design based on population data. We used the administrative databases from the universal governmental healthcare insurance plan in the province of Québec (Régie de l'assurance maladie du Québec – RAMQ). Multiple databases were linked together using a unique patient identifier. These databases include billing claims of i) medical services and ii) pharmaceutical services, iii) demographic data on individuals covered by the healthcare plan, and iv) eligibility data for the governmental medical insurance plan. In the province of Quebec, individuals aged less than 65 years old and their family members, are obliged to be insured by either a private or a shared plan supported by their employer or professional association. In contrast, those who are not employed, those who do not have access to an employer-supported health care plan, those who are self-employed, as well as all patients aged 65 years old or more, receive prescription medication coverage at minimal cost through a governmental insurance program. Available prescription information includes drug class, generic name, dosage per unit, quantity, prescription duration, dispensing date, and prescriber's specialty is included in the database.

In addition to the public drug plan, coverage of medical services has been universal since 1970 for all residents of the province regardless of age or income. Physicians are compensated on a fee-for-service basis and they bill directly to the government. The medical services database includes a unique patient identifier, the diagnosis (International Classification of Diseases, ninth revision [ICD-9] code), procedures performed, the date of each service and the type of physician (specialist or general practitioner). In addition, the database provides information on whether medical services were provided on an inpatient or emergency basis. Vital status information was obtained from the same databases linked

to pension and care insurance for completeness of information. The patient's unique encrypted healthcare insurance number was used for linkage of data.

The accuracy of RAMQ prescription claims in the assessment of drug use and of medical services claims to assess event were both validated.^{432, 433} This data source is used commonly, by multiple research groups⁴³⁴⁻⁴³⁶, including ours, in one of the first studies to suggest an anticancer effect to statins³⁷⁸ as an example. The validity of diagnostic codes has not specifically been examined against other clinical source of data in the context of bladder cancer; this is why we based our outcome definition on billing procedure codes independently of diagnostic codes. However, the construct validity of the bladder cancer data has been examined in that it was used in previous peer-reviewed publications.⁴³⁷⁻⁴³⁹

Study population

We used a predetermined selection algorithm detailed in Figure 4, and outlined here. Data obtained from RAMQ included all patients that had at least one billing code with a diagnosis of bladder cancer between July 1st 1995 and March 31st 2002 (n= 208,597). Of those we selected individuals aged 18 years old or more who had at least one transurethral resection of a bladder tumor (TURBT, procedure code 6168) and with a minimum of six months of follow-up (n=12,477). Index date was defined as the first TURBT billing code for each patient. With an attempt to increase specificity of bladder cancer cases, we then selected only patients who had a diagnosis of bladder cancer (ICD 9 diagnostic code 188.0, 188.1, 188.2, 188.3, 188.4, 188.5, 188.6, 188.7, 188.8 and 188.9 [malignant neoplasia of the bladder]; ICD9 code 233.7 [carcinoma *in situ*] ; ICD9 code 239.4 [neoplasia of unspecified nature of the bladder]) at index date or during the next few visits with a urologist, since the formal diagnosis may have been made after index TURBT (n=10,879).

In order to identify incident bladder cancer cases, we excluded patients who had a cystoscopy (procedure code 320) in the two years preceding index dates, except within three months before index date where one cystoscopy was allowed because it consisted in

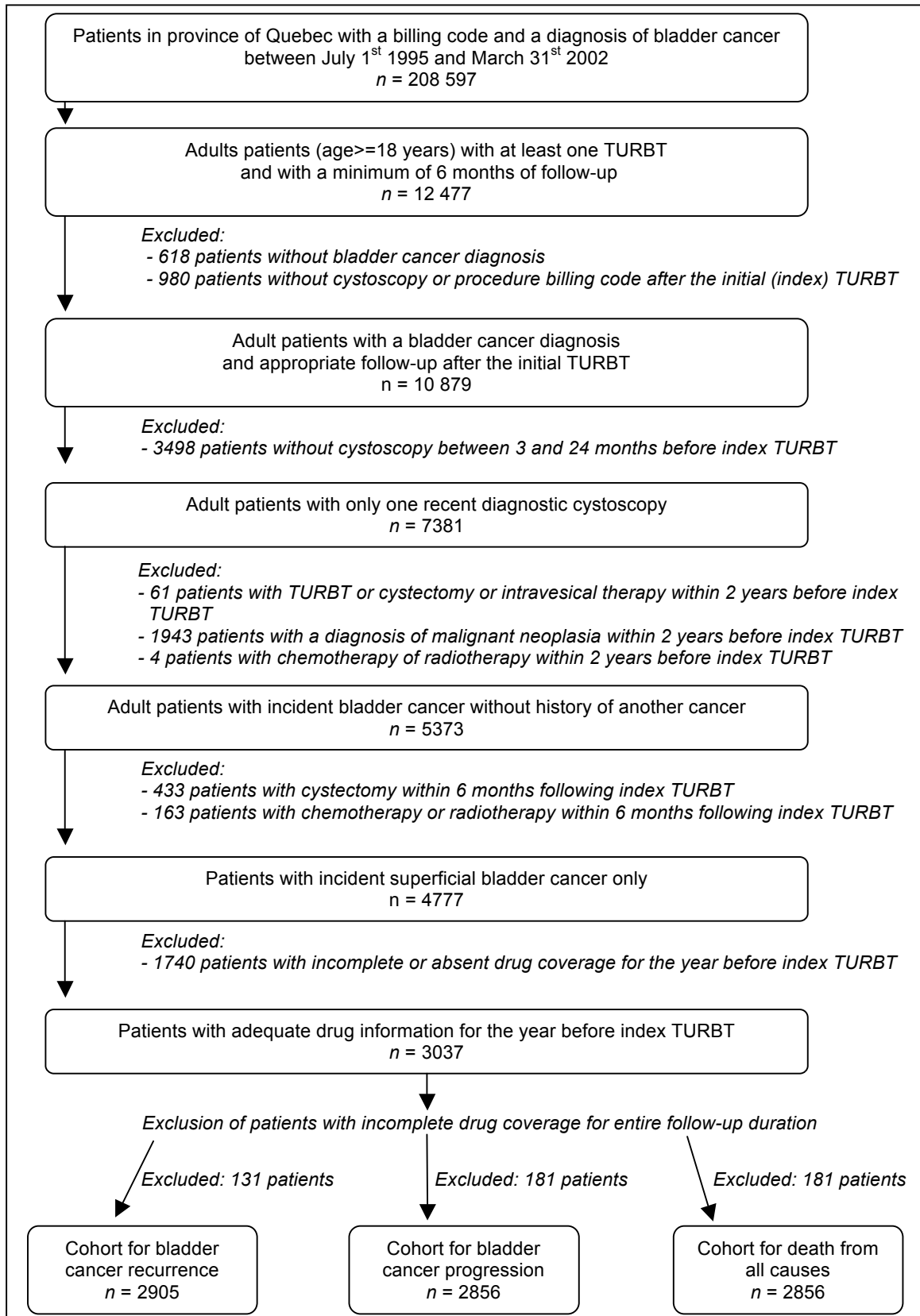
the diagnostic cystoscopy identifying the bladder tumour (n=7,381). We also excluded patients who had any procedure related to bladder cancer during the 2 years before index date, including TURBT or a radical cystectomy (procedure codes 6205 and 6338) or a partial cystectomy (procedure codes 6113 and 6224) or any intravesical therapy (procedure codes 325, 482 and 493). We also excluded, within the same time frame of two years preceding index date, patients that had a billing code attached with a diagnostic code of malignant neoplasia, or treated with chemotherapy or radiation therapy. These exclusions before index date gave 5,373 patients. Of these, we excluded patients that had an invasive or advanced cancer at initial diagnosis defined as receiving a cystectomy or chemotherapy or radiotherapy within six months after index date. We thus identified 4,777 patients who had an incident superficial bladder cancer as sole cancer. Of these, we then selected patients with complete drug coverage for one year before index date, which gave 3,037 patients. Then, for each cohort constructed to assess each of the three main study outcomes, to better define drug exposure, we restricted the analyses to patients with complete drug coverage from index date to end of follow-up. As an example, this gives 2,856 patients in the cohort assessing cancer progression.

Ascertainment of bladder cancer progression outcomes

Bladder cancer is unique in that virtually every monitoring (cystoscopy), disease recurrence and progression event can be linked to a procedure. Like all other procedures, the billing claim is made with specific procedure and diagnostic codes. We capitalized on the natural history and clinical monitoring setting, relying on procedures, to accurately reconstruct medical records for a large population, based on administrative databases.

Patients were followed routinely with endoscopic examination of their bladder—cystoscopy—as it is the routine means of surveillance; this is tracked by a claim for this procedure code (320 or 319). Bladder cancer recurrence was defined as a billing claim for a TURBT procedure code (6168) made by a urologist. Cancer progression happens when the tumor progresses to a deeper, muscle infiltrating stage, diagnosed with pathologic assessment of the repeat TURBT specimen. This progressive disease state must be treated

differently than simple local recurrence, with a more invasive treatment: radical cystectomy. For the purpose of our study, cancer progression was thus defined as a billing claim for radical cystectomy procedure (code 6205), a procedure code that is used only for invasive or progressing bladder cancer. Finally, death from all causes was the last possible outcome event. Only month of death was available and we attributed the last day of every month as the actual study date of death. When outcome did not occur, follow-up was censored at end of available data, on March 31st, 2002.

Figure 4. Patient selection algorithm

Assessment of statin drug use

Statin exposure was precisely measured in all patients from index date until end of follow-up, using the pharmacy prescription claims data.

For the main analyses, and because statin is usually a drug that is prescribed chronically once started, individuals were considered exposed from the moment they filled their first statin prescription (time-dependent for start of statin use). In our study cohort, 15% of statin users eventually stop using statins for a period of at least 30 days. Yet, these patients are considered exposed to statins even after they stop filling their statin prescription. However, using the time-dependent modelling strategy described below, individuals were not considered exposed before start of statin use.

Modelling of statin use was continually updated on each day, based on the patient's filling of the prescription at pharmacy. We summed the number of days of the duration of each prescription filling claim, even if the prescription was filled days before the end of the previous prescription. We used a time-dependent statin use variable where the patient was considered exposed when the first statin prescription was filled until the end of study follow-up, because the potential anti-cancer effect is assumed to be a chronic one.

For dose-response association assessment, we calculated a statin dose equivalent across all types of prescribed statin. Even though the potential effective statin dose for cancer is unknown, we based our dose equivalent calculations on recent meta-analysis studies of effect of statins on cardiovascular outcomes⁴⁴⁰⁻⁴⁴³ and were inspired by other examples using statin equivalence, even for unexpected effects of statin^{429, 444, 445}. We thus calculated an atorvastatin equivalent whereby the following doses were assumed to have a similar effect: atorvastatin 1mg = cerivastatin 0.1mg = simvastatin 2mg = lovastatin 4mg = pravastatin 6mg = fluvastatin 8mg.

The time-dependent variable was the cumulative quantity of the statin consumed since index date. Thus, at each failure time, the cumulative dose of statin up to that point in

time was used to quantitatively quantify exposure in the risk set, with the reference being zero, i.e. men not using statin and that never did until that point in time. Here, men who stopped using statin carried their accumulated dose thereafter.

Statistical analysis

We tabulated means and proportions for demographic and other descriptive factors at baseline index date (initial TUR-BT), tabulated by statin use at index date. We used Cox proportional hazards regression analysis to calculate age-adjusted and multivariable-adjusted hazard ratios [HRs] and 95% confidence intervals [CIs] of risk of bladder cancer recurrence, local progression necessitating cystectomy or death from all causes. All models were stratified by age (years). The proportional hazards assumption was examined and tested by adding an interaction term for statin use and the log of follow-up time to the models; this term was not significant, confirming the assumption. We also tested the assumption using the supremum test for martingale residuals which gave the same confirmation.

To quantify bladder cancer aggressiveness, we computed different time-dependent variables, as the events used to define those variables occurred over follow-up time. These events, identifiable by means of a billing claim, are measures of cancer aggressiveness, in increasing order of magnitude: i) intravesical therapy is given to patients with high-risk tumours, in an attempt to prevent tumour recurrence; ii) tumour recurrence necessitating TURBT, especially early in time, places a patient at higher risk of cancer progression to a more invasive stage; iii) cancer progression necessitating radical cystectomy represent the most aggressive localised cancer type of the spectrum and places an individual at higher risk of death from bladder cancer. Thus, use of intravesical therapy (procedure code 325), was included in multivariable models evaluating tumour recurrence; tumour recurrence was included in models of cancer progression and mortality; and cancer progression was included in models of mortality.

To assess whether or not confounding by indication was underlying the observed association between statin use and the different study outcomes, we compared statin use to other hypolipidemic drugs. During follow-up of the patients included in the final cohort, we measured the number of prescriptions of the following drugs: cholestyramine (467) nicotinic acid (254) gemfibrozil (1674) colestipol (25) fenofibrate (3509) bezafibrate (415). A total of 136 patients used non-statin hypolipidemic agents. Similarly to that for statin use, we modelled current use of non-statin hypolipidemic drugs as a time-dependent variable. We compared univariable and multivariable models of current use of statins to those of current use of non-statin hypolipidemic drugs. We also adjusted statin models with current use of non-statin hypolipidemic drugs as a covariable.

Results

Table 7 gives the specific descriptive characteristics of our cohort at index date. Statin users were more likely to have comorbid conditions, as reflected by a higher mean chronic disease score (Student's *t*-test $p = <.0001$). Statin users consulted somewhat more frequently with a first line physician ($p = 0.0757$), but clearly more frequently with a specialist physician ($p = <.0001$) but not with a urologist ($p = 0.2555$).

Current use of statin was not associated with bladder cancer recurrence. However, compared to non use, current statin use was inversely associated with progression to muscle-invasive disease necessitating radical cystectomy after adjusting for age (HR = 0.47, 95% CI = 0.23 to 0.95, $p=0.0363$) and after additionally adjusting for other potential risk factors for bladder cancer recurrence (HR = 0.38, 95% CI = 0.18 to 0.84, $p=0.0160$) (**Table 8**). The observed incidence rates of cancer progression to muscle invasive disease necessitating radical cystectomy was of 0.53 and 0.87 per 100 person-years among statin users and non-users (i.e., never users) respectively. The inverse association was even stronger for risk of mortality from all causes (HR = 0.57, 95% CI = 0.43 to 0.77, $p=0.0001$) (**Table 8**).

Table 7. Characteristics of subjects in cohort evaluating bladder cancer progression

Characteristic	All patients	Use of statin during follow-up		p-Value*
		no	yes	
Patients (n)	2856	2081	775	
Gender				0.3834
women (n)	812	601	211	
Male (n)	2044	1480	564	
Age at initial TURBT (mean \pm std)	71.3 \pm 9.4	71.8 \pm 10.1	69.8 \pm 7.2	<.0001
Chronic Disease Score (mean \pm std)	3.34 \pm 3.2	2.92 \pm 3.2	4.49 \pm 3.1	<.0001
No. of hospitalizations (mean \pm std)	0.81 \pm 1.1	0.81 \pm 1.1	0.81 \pm 1.2	0.9744
No. of visits to family physician (mean \pm std)	5.69 \pm 5.6	5.57 \pm 5.7	5.99 \pm 5.5	0.0757
No. of visits to other specialist (mean \pm std)	6.16 \pm 9.1	5.50 \pm 8.4	7.93 \pm 10.6	<.0001
No. of visits to urologist (mean \pm std)	2.61 \pm 1.4	2.59 \pm 1.4	2.66 \pm 1.4	0.2555
No. of visits to emergency room (mean \pm std)	2.04 \pm 3.7	2.10 \pm 3.9	1.90 \pm 3.2	0.1679
Adjuvant intravesical treatment				0.0589
Yes (at least once)	823	620	203	
No	2033	1461	572	

* from Pearson's Chi-Square test for categorical variables and Student *t*-Test for continuous variables

We observed a dose-response pattern: the effect of statin use appeared dose-related. For cancer progression, we observed a 13% risk reduction for every additional gram of

statin consumed ($p=0.0361$ for the β coefficient of the time-dependent cumulative statin dose equivalent); for overall mortality, we similarly observed a 5% risk reduction ($p=0.0471$).

Although death here is from all causes, a more aggressive bladder cancer increased significantly the risk of death, suggesting that death is a valid end-spectrum measure of bladder cancer evolution in our cohort. Each bladder cancer recurrence necessitating a repeat TURBT increased the risk of death by 17% ($p<0.0001$). Having a bladder cancer progression necessitating a radical cystectomy increased by more than 3-fold the risk of death (HR 3.46, $p<0.0001$).

We also investigated whether or not the association observed may have been caused by indication bias, i.e. having a dyslipidemia. Statin drugs are commonly prescribed to patients having a dyslipidemia. Having a dyslipidemia in itself, either directly from altered blood lipid levels acting on cancer cells or via other mechanisms, could be linked to a different outcome pattern. Potentially, this could confound the association observed. We compared current statin use and current non-statin hypolipidemic drug to nonuse as a reference and between groups. Contrary to that for statins, we found that, non-statin hypolipidemic drugs had no effect on bladder cancer progression (HR=1.068, 95%CI= 0.243 to 4.689, $p=0.9306$). Also contrary to that for statins, use of non-statin hypolipidemic drugs may be associated with an increased risk by about 50% of all-cause mortality (HR=1.515, 95%CI= 0.908 to 2.529, $p=0.1121$).

Table 8. Association between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death)

Outcome event	Use of statin during the follow-up		(95% CI)	p-Value
	no	yes		
Recurrence				
No. of cases	1241	345		
Person-years at risk*	4897.81	1244.10		
Rate /100 persons-years*	25.34	27.73		
HR age-adjusted [†]	1.00 (reference)	1.10	(0.97 - 1.25)	0.1324
HR multivariate [‡]	1.00 (reference)	1.10	(0.96 - 1.25)	0.1598
Progression				
No. of cases	57	9		
Person-years at risk*	6522.94	1706.76		
Rate /100 persons-years*	0.87	0.53		
HR age-adjusted [†]	1.00 (reference)	0.47	(0.23 - 0.95)	0.0363
HR multivariate [§]	1.00 (reference)	0.38	(0.18 - 0.84)	0.0160
Death from all causes				
No. of cases	427	64		
Person-years at risk*	6606.59	1723.30		
Rate /100 persons-years*	6.46	3.71		
HR age-adjusted [†]	1.00 (reference)	0.72	(0.55 - 0.95)	0.0190
HR multivariate	1.00 (reference)	0.57	(0.43 - 0.77)	0.0001

* Immortal time period is accounted for in these calculations, whereby time between index date and first prescription of statin is transferred to the non-user group.

[†] all models were stratified by age (years)

All multivariate Cox models were adjusted for age (strata), sex (strata).

[‡] Cox models for recurrence were also adjusted for intravesical treatment (time-dependent).

[§] Cox models for progression were also adjusted for bladder cancer recurrence (time-dependent).

^{||} Cox models for death were also adjusted for chronic disease score, number of hospitalisations in the year before index date, and bladder cancer progression (time-dependent)

Also, global medication use, indirectly measured by the chronic disease score, as expected, was associated with risk of death as a univariate predictor (HR = 1.103 per unit of score, 95% CI = 1.075 to 1.133, $p < 0.0001$) and remained significant in the multivariate models (HR = 1.11, 95% CI = 1.08 to 1.14, $p < 0.0001$). However, chronic disease score was not associated with bladder cancer progression (univariate HR=0.985, 95%CI= 0.911 to 1.065, $p=0.7053$; multivariate HR=0.997, 95%CI= 0.911 to 1.090, $p=0.9410$). This suggests that the observed statin effect is not confounded by comorbidities or the effect of another drug.

Discussion

There is mounting evidence that statins affect cancer biology³⁸⁸. Although controversial, statins may prevent development of multiple cancers^{378, 379, 382, 446}. However, studying statins as primary prevention of cancer poses logistical and financial challenges⁴⁴⁷. We thus sought to examine the effect of statins on superficial bladder cancer recurrence and progression after initial treatment. This population of cancer survivors could potentially be studied in a trial more easily as they are at risk of progression and already followed. We found that statin use was associated with a decreased risk of bladder cancer progression and overall mortality. Importantly, this observation is based on global population data, facilitating generalizability of the findings.

Little is known about the effect of statin use on risk of cancer recurrence after initial treatment. We are the first group who conducted a study on patients diagnosed with superficial bladder cancer, even though this early stage of the disease is where prescription of a drug may have the greatest potential for impact. Another study was conducted in patients with muscle-invasive disease treated with maximal TURBT followed by a combination of chemotherapy and radiation therapy at a single institution. In univariate analysis, statin use at time of treatment was associated with a lower risk of disease recurrence (27% vs 48%, $p=0.04$). However, the association did not remain significant

when time and other risk factors were taken into account. Remained significant only chemotherapy with cisplatin ($p=0.02$) and absence of hydronephrosis ($p=0.01$), which may be considered as an indirect measure of disease stage⁴⁴⁸.

Recent studies have examined the effect of statins on the cancer evolution after initial treatment of other cancer types. Risk of prostate cancer recurrence appears reduced by use of statin after radical prostatectomy⁴²⁹ and after radiation therapy⁴²⁸. As well, risk of breast cancer recurrence appears reduced by statin use after initial treatment including mastectomy but excluding hormonal therapy.⁴³⁰ In a large Danish registry cohort study,⁴⁴⁹ only lipophilic statins—mainly simvastatin—appeared to decrease the risk of breast cancer recurrence, whereas hydrophilic statins did not. In contrast, risk of colon cancer recurrence was not affected by statin use. This study retrospectively conducted in patients that were enrolled in a randomised adjuvant chemotherapy trial, patients at high risk of disease progression. Although controversial, if statin effects were similar across cancer types, this would point to a biological mechanism that is common to all cancers such as inhibition of mevalonate pathway⁴⁵⁰, cell proliferation, apoptosis or angiogenesis.

Several methodologic issues relating to the design and analysis of this study are worth mentioning because they may affect the interpretation and inference made from the study findings.

The first issue relates to measurement of statin exposure. Notwithstanding that patients may fill their prescription claim without actually consuming the drug, statin exposure is close to being as precisely measured as possible using administrative database restricted to patients with complete coverage during the period of exposure measurement, like we did here. Also, there is a general high confidence that the drug dispensed is actually consumed when patients must take charge of a co-payment fee, which is the case here. Other sources of drug delivery may exist but are unlikely in the province of Quebec as this medication coverage plan is the least expensive one and, by law, is allowed only under certain circumstances; in particular, no overlap with another medication coverage plan is allowed. Thus, misclassification of exposure is unlikely to explain the observed

association, especially since it would be expected to be non-differential regarding diagnosis of bladder cancer progression. This situation would have led to a relative risk estimate closer to the no-association value of 1.0.

The second issue relates to the handling of time both for the exposure definition and for the analysis. Immortal time is accounted for in our analyses. Many recent studies of statin use for cancer recurrence do not account for time between index date and start of statin use^{430, 451}; this time period is, by definition, immortal and occurs only in exposed patients. This usually biases the association towards a stronger protective effect. Here, the potential effect of immortal time bias has been accounted for in the analyses.

The third issue is the possibility of detection bias, or confounding by differential use of medical care, whereby statin users may be more closely followed rendering more likely the detection of a cancer recurrence, when present. However, because of the large sample size and complete billing information for all of the study subjects, we were able to examine the association between statin use and intensity of medical care. During the year preceeding index date and compared to non-users, statin users at baseline index date had a similar number of visits with urologists ($p=0.2555$) a similar number of visits with primary care physicians ($p=0.0757$) but a greater number of visits with specialized physicians ($p<0.0001$). Adjusting our models for physician visits did not materially change our findings (data not shown). Also, a technique useful to control for the potential detection bias is restricting the analyses to outcomes with greater severity³⁹⁸; this is exactly what we did here. We observed no association with cancer recurrence (less severe) but observed stronger associations with both cancer progression (more severe) and mortality from all causes (most severe).

The fourth issue is the possibility of confounding by unmeasured factors. Because our study is based on administrative data, not all potential confounders were measured. Smoking is an important potential confounder that we could not assess. Multiple predictors of tumour recurrence and progression are known: histological grade, stage, multifocality, and presence of associated carcinoma in situ. Even though we did not have this potentially

important pathological data, we were able to model tumour aggressiveness using the expected consequence of these variables on the evolution of the disease, i.e. cancer recurrence, progression, etc. Also, more aggressive tumours are usually treated with intravesical therapy, a procedure that was also used as a measure of aggressiveness. Even if intravesical therapy might have been incompletely captured, we believe it measured, at least partly, tumour aggressiveness because it was significantly associated with an increased risk of cancer recurrence. This likely corresponds to indication bias of intravesical therapy. Indeed, only more aggressive bladder tumours will be treated using adjuvant intravesical therapy. Thus, patients receiving intravesical therapy are at greater risk of tumour recurrence. The other measures of disease aggressiveness (recurrence—TURBT and progression—cystectomy) are easily captured since they are important procedures in the urologist's armamentarium.

The last issue, critically important in pharmaco-epidemiology, is the possibility of confounding by indication. This is why we examined drugs prescribed with the same indication as statins. The absence of known association between non-statin hypolipidemic agents and any study outcome suggests that indication for statin prescription does not underlie the observed association. Furthermore, the typical indication bias of a drug leads to a detrimental effect. Here, statin users were protected against study outcomes, even mortality. If statin use did not have an effect on cancer, statin users should be at increased risk of death (e.g. from cardiovascular causes), simply because of their underlying dyslipidemia.

In summary, we observed a reduced rate of both bladder cancer progression to a more invasive disease and of death from all causes in patients prescribed statins, whereas use of statins was not associated with bladder cancer recurrence. It appears premature to recommend the use of statin drugs to improve disease evolution and survival in patients with superficial bladder cancer. Further work in this field both to better understand the biological mechanisms underlying this association and to better describe the effect of

statins on bladder cancer in humans is strongly encouraged by our findings. These provide early rationale for a randomised controlled trial of statins after diagnosis of superficial bladder cancer should be conducted.

Funding

This work was supported by the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQ-S training grant #13711)

2.3. L'importance du temps immortel en épidémiologie du cancer.

Cet troisième article scientifique original est intitulé « Immortal time in pharmaco-epidemiologic studies of unintended drug effects on cancer : example of statins and bladder cancer evolution ». Le manuscript de cet article de revue, ayant un caractère pédagogique pour des cliniciens et chercheurs s'intéressant au domaine de l'oncologie, a été soumis à la revue *Cancer*.

Étant l'auteur principal de cet article, j'ai fait ou dirigé moi-même l'ensemble des efforts menant au manuscript final, en incluant la conception de l'étude, la compilation des données, leur analyse ainsi que la rédaction du manuscript. Évidemment, ce travail en est un de collaboration, où les différents mentors de ce projet ont assuré une supervision étroite et instructive.

Importance of immortal time bias in cancer epidemiology: example using statins for prevention of bladder cancer progression

Running Title: Immortal time bias in cancer

Authors: Vincent Fradet, MD^{1,2,3}, Fred Saad, MD^{3,4}, Thierry Duchesne, PhD^{5,6}, André Caron, PhD², Jacques Leloirier, MD, PhD^{3,7}

Author affiliations: ¹ Department of Surgery/Urology, Laval University, Quebec, Canada;

² Laval University Cancer Research Center, CHUQ – L'Hôtel-Dieu de Quebec, Quebec, Canada; ³ CHUM Research Center, University of Montreal, Montreal, Canada

⁴ Department of Surgery/Urology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada; ⁵ Department of Mathematics and Statistics, Laval University, Quebec, Canada;

⁶ Population health unit (URESP), Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec, Québec, Canada ⁷ Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada

Address correspondence to: Vincent Fradet, MD, Laval University Cancer Research Centre, CHUQ – L'Hôtel-Dieu-de-Québec, 10, McMahon street, suite 0852-1, Quebec, QC, G1R 2J6, Canada. Telephone: (418) 691-5561. Fax: (418) 691-5562

Keywords: epidemiology, cohort studies, information bias, immortal time, cancer outcomes, bladder cancer, statins

Financial disclosures: none

Funding: Vincent Fradet has received funding for doctorate studies from the Fonds de Recherche Québec – Santé (FRQS)

Numbers: text pages (20, including title, references, legends), tables (7), and figures (5)

ABSTRACT

Immortal time arises in observational studies when, because of exposure definition, the outcome under study could not occur during a period of follow-up time. Bias from immortal time was first identified in the 1970s but the term was really coined more recently when it resurfaced in pharmaco-epidemiology, with many studies of chronic diseases reporting that various medications were effective at reducing mortality.

In this paper, authors review the different aspects of this bias and show that it is also common in studies of cancer outcomes. The importance of the bias is illustrated with data about statin use and bladder cancer evolution.

INTRODUCTION

The randomized controlled trial is the preferred study design to test efficacy and safety of interventions. This will lead to regulatory approval for their use in clinical practice. This experimental study design minimizes biases and optimizes the quality of the trials conclusions. Yet, this study design rarely provides evidence about the pragmatic benefit of different interventions including pharmacological ones. This is because of the inherent selection biases and necessarily rigid structure underlying the conduct of a trial. Non-experimental observational studies have been conducted in pharmaco-epidemiology and in other fields using computerized databases. These studies were conducted in an attempt to fill a gap left by randomized controlled trials. These study designs are particularly useful to assess long-term effects of medications on rare or distant outcomes, including mortality. Specifically, the field of pharmaco-epidemiology has primarily concerned itself with the study of adverse drug effects, which are usually rare. Albeit often important, major side effects may have a too long latency period to be detected in the context of randomized controlled trials. Also, the study of unexpected effects of medication can be more readily identified when using this type of observational design.

Many studies have used a cohort design. It is attractive, for it emulates the structure of a randomized control trial design. Researchers using this cohort design, however, in their attempt to simplify data presentation and analysis, have produced a form of bias called immortal time bias.⁴⁵² Biostatisticians have long understood the concept underling the more modern definition of immortal time bias. Indeed, in 1843, William Farr described "the statistical artifact created by classifying persons by their status at the end of follow-up and analyzing them as if they had been in these categories from the outset."⁴⁵³

More recently, this bias was first identified in the 1970's in an attempt to quantify the benefit of heart transplant surgery in two studies.^{454, 455} Gail⁴⁵⁶ pointed out a source of the bias in these two studies: the waiting time for all patients who survived to make it to the transplant was not properly accounted for in the data analyses. Individuals were classified

as exposed or unexposed to heart transplant surgery from the outset. However, the waiting time (while it was truly an unexposed period) was considered as exposed follow-up time in that study and completely explained the observed association. Indeed, these were the early days of transplantation surgery where techniques were still in their infancy and not effective yet. Mantle and Byar⁴⁵⁷ showed in a re-analysis of this transplantation data, how to construct Kaplan-Meier-like "life tables" in which persons can move from exposure status to another.

In modern epidemiology context, Suissa coined the term "immortal time bias", when he documented the concept in studies of treatments for chronic obstructive pulmonary disease^{111, 458}. The bias was shown to systematically underestimate the rate ratio thereby creating the false illusion that medication was effective at reducing the rate of outcomes.⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹ Suissa illustrated with 20 observational studies where the effect of commonly prescribed drugs were subject to immortal time bias.⁴⁶²

Other authors also named immortal time bias differently. In 2004, Van Walraven et al.⁴⁶³ called this bias time-dependent bias. In their review, they identified 52 studies that were susceptible to immortal time bias. They defined the "baseline immeasurable" time dependent variable as one that could not be measured at baseline and that indicated what happen to patients during observation. They concluded that over half of the studies may have had a qualitative change in the study conclusion had the bias been corrected. They gave an elegant example illustrating the case of a time dependent variable analyzed as a fixed variable:

"Consider a hypothetical study determining prognostic factors for patients who have a perforation of the sigmoid and undergo emergency hemicolectomy with colostomy. Patients who died in the first several months after the operation will never undergo closure of their colostomy. If this baseline immeasurable time dependent factor ("was colostomy closed?") is analyzed in a survival analysis as a fixed variable, one would associate no colostomy closure with a worst survival. This association is erroneous, because death results in colostomy not getting closed, rather than vice versa."

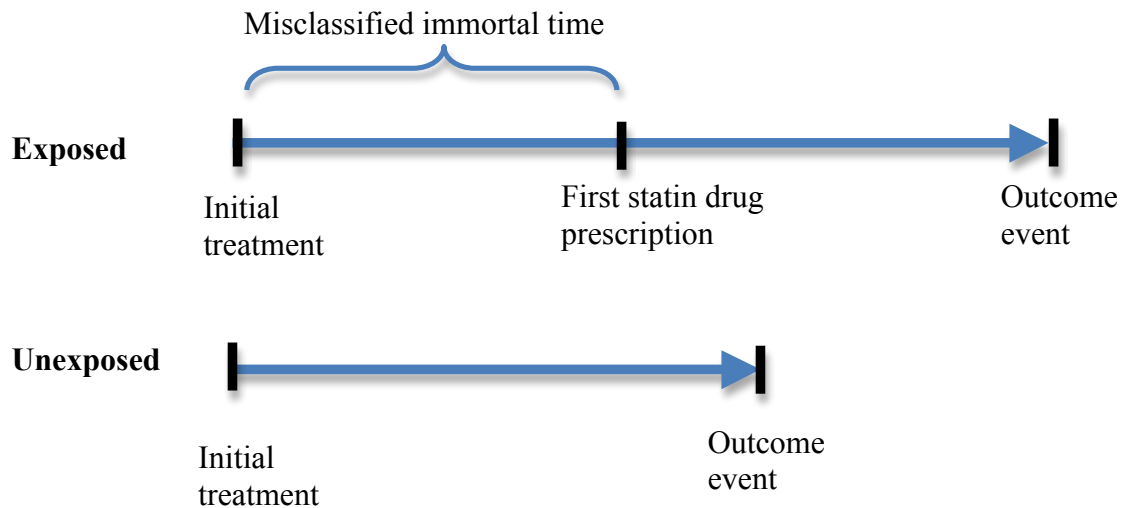
Immortal bias was also called survivor treatment selection bias⁴⁶⁴ in the context of AIDS literature. The authors illustrated that those who die earlier may be untreated by default, because they do not have the opportunity of receiving the treatment. In other words, longer survival in itself is associated with treatment use, simply because patients who live longer have more time and more opportunities to have access to a specific treatment.

Immortal bias was also named survival bias associated with time-to-treatment by researchers from McGill University.⁴⁶⁵ They illustrated various methods, and their limitations, to control for this bias using RAMQ Administrative Data from Province of Quebec. They showed the magnitude of immortal time bias underlying the effect of statin use in the context of death or recurrence after acute myocardial infarction.

The bias is also occasionally described immune person-time. Immune person-time is similar to immortal person-time, but it pertains to outcomes other than deaths.⁴⁶⁶

Immortal time bias is thus, most commonly, a misclassification of exposure over a certain period of time (Figure 5). This misclassification refers to a period of follow-up during which, by design, death or the study outcome cannot occur.⁴⁶⁷ In pharmaco-epidemiologic studies, immortal time typically arises when the determination of an individual treatment status involves a delay or wait period during which follow-up time is accrued. Various aspects contribute to bias the estimate across exposure groups. First, a subject with early event is less likely to be exposed over time merely because the opportunity was low. Second, the subject who fills a prescription later in time is, by definition, free of endpoints during this time period. Thus, immortal time is particularly problematic because it necessarily biases the result in favor of the treatment under study conferring a spurious survival advantage to the treated group.

Figure 5. Schematic representation of immortal time in a typical cohort study



When comparing exposure that includes immortal person-time, it yields a downwardly biased outcome rate and an upwardly biased survival curve. However, comparing rates or survival curves among categories of exposure can lead to a net effect of immortal percent-time bias in any possible direction.⁴⁶⁶

There are many situations where immortal time bias may occur. Examples in pharmaco-epidemiology of chronic diseases are quite common and have been clearly described.^{452, 462} Another situation is non-randomized studies of adherence to protocols. For example, in a study of delayed start of radiotherapy on breast cancer recurrence¹¹⁶ the time between breast cancer surgery to start of radiotherapy was accrued in the exposed category. This time is immortal and should have been excluded from the exposed category follow-up.

Immortal time can even happen in studies of genetic determinants of cancer outcomes among patients with cancer. When genotyping is conducted on blood drawn from patients after diagnosis or after treatment, then person-time between diagnosis or treatment and drawing of blood is immortal. Evidently, patients who do not survive to give blood cannot be included in the study. A good example would be the effect modification of tamoxifen by CYP2D6 genotype in metastatic breast cancer patients.⁴⁶⁸

The magnitude of the bias from immortal time will depend on two factors: the rate of event during the inappropriately classified immortal time periods and the length of the immortal time period.

Immortal time may be identified by asking appropriate questions when reading a paper [adapted from Levesque et al.⁴⁶⁹]:

- a) Was treatment status determined after the start of follow-up or defined using follow-up time?
- b) Was the start of follow-up different for the treated and untreated (or comparator) group relative to the date of diagnosis?
- c) Were the treatment groups identified hierarchically (one group before the other)?
- d) Were subjects excluded on the basis of treatment identified during follow-up?
- e) Was a time fixed analysis used?
- f) Even if a time-dependent analysis was used, were exposure categories determined during follow-up?

This last point is a subtle form of the immortal time bias and is a feature highlighted in this paper; it represents a form of selection bias due to grouping of patients. A good example of this is a *posteriori* definition of exposure intensity categories found in a recent publication about statin use and risk of diagnosis of prostate cancer.⁴⁵¹ The authors defined study follow-up using a standard approach: "from the start of the study until the outcome event or last follow-up". However, the definition of statin exposure generates the immortal

time bias in this case: "participants who reported statin use before the outcome were considered exposed". Not surprisingly, statin use is associated with a reduced relative risk of every study outcome defined as increased PSA, prostate biopsy, prostate cancer and high-grade prostate cancer. All findings are statistically significant. However, the more subtle form of the bias is when they define categories of exposure intensity: "duration of statin use was defined as the time from the reported start of the medication to the event date or date of last follow-up"; i.e. exposure intensity categories were defined at the end of the follow-up and serves to compare patients between them from the start of follow-up. It is obvious from these categorical definitions that the longer the follow-up without an event, the greater the chance of longer duration of statin use. This creates a spurious protective association for longer duration of use. Not surprisingly, this is exactly what was observed in the study for all study outcomes.

Another cancer example of immortal time bias is found in a study of the impact of the duration of adjuvant hormonal therapy in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy.⁴⁷⁰ This recent study is a secondary analysis of randomized controlled trial RTOG 85-31, which was a randomized trial of androgen suppression for life for patients with locally advanced prostate cancer. However, not all patients continued on the protocol mandated long term hormonal therapy despite no evidence of recurrence. The authors categorized patients based on the duration of hormonal therapy duration defined at the end of accumulated follow-up. "Time to event was measured from the randomization date to date of failure event". The authors conducted elegant survival analyses accounting for competing risks. However, these studies were still biased by immortal time. Here again, patients that survived a longer period of time were more at risk to have a long duration of hormonal therapy. The most significant findings were the association between hormonal therapy duration and failure free survival, or overall survival, both of which were highly statistically significant. When looking at the survival curves, immortal time bias is apparent: no event occurred in the hormonal therapy duration group of more than five years during the first five years of follow-up. Then, the slope of the curve, or the rate of event, is identical to that of the two other groups.

Demonstration of bias

In a study recently conducted by our group, we examined the effect of statin use on superficial bladder cancer evolution after initial surgical treatment. Outcomes were defined as bladder cancer recurrence (a repeat transurethral resection of a bladder tumor, procedure code 6168), or as bladder cancer progression (progression to a muscle infiltrative stage necessitating a radical cystectomy, procedure code 6205), and death from all causes. We used medical administrative databases from Quebec, Canada. We illustrate here different methods of data analysis that may lead to immortal time bias, including the more subtle categorization of exposure intensity. We will also illustrate how this bias may be controlled for, using proposed techniques.^{452, 465}

The study population cohort was created using restriction criteria to identify all adult patients with a superficial incident bladder cancer, without history of another cancer, and in whom we had complete drug coverage information for the year before index transurethral resection of a bladder tumour. We also mandated complete drug coverage for the complete follow-up period until cancer recurrence or end of follow-up.

We identified all statin prescriptions dispensed during follow-up to determine individual treatment status. We had information on date, dosage and duration of each statin prescription for each individual.

We first illustrate the time-fixed analyses in different ways. Using a simple method, patients were considered statin user if they had at least one prescription of statin during follow-up. Figures 6 and 7 show, respectively, the Kaplan-Meier curves of bladder cancer recurrence and progression stratified by statin use (versus non-use). Figures 8 and 9 show the same survival curves stratified in four groups of statin use: non-users and tertiles of total statin use over follow-up time.

All sets of curves show strongly statistically significant differences (p-value between 0.032 to <0.0001) per the log rank test. However, in these time-fixed analyses all

person-time between cohort entry and end of follow-up was classified as exposed for those who met the statin user definition, regardless of the moment that they actually started using statins.

We then illustrate the simple-time dependent method that illustrates very well the importance of the immortal time bias by quantifying the actual amount of immortal person-time.^{452, 453, 465, 469} Tables 9 and 10 give the details of the amount of person-time that was actually immortal time versus the amount of person-time truly at risk for the outcome event, once the person becomes a statin user. All follow-up time is correctly classified at risk for the statin non-users: by transferring the immortal person-time to the unexposed group, we have a better estimate of the rate ratio by simply dividing those corrected rates. This shows that immortal time, in this case, completely explained the statin effect on bladder cancer recurrence.

Figure 6. Kaplan-Meier curves of bladder cancer recurrence stratified by statin use.

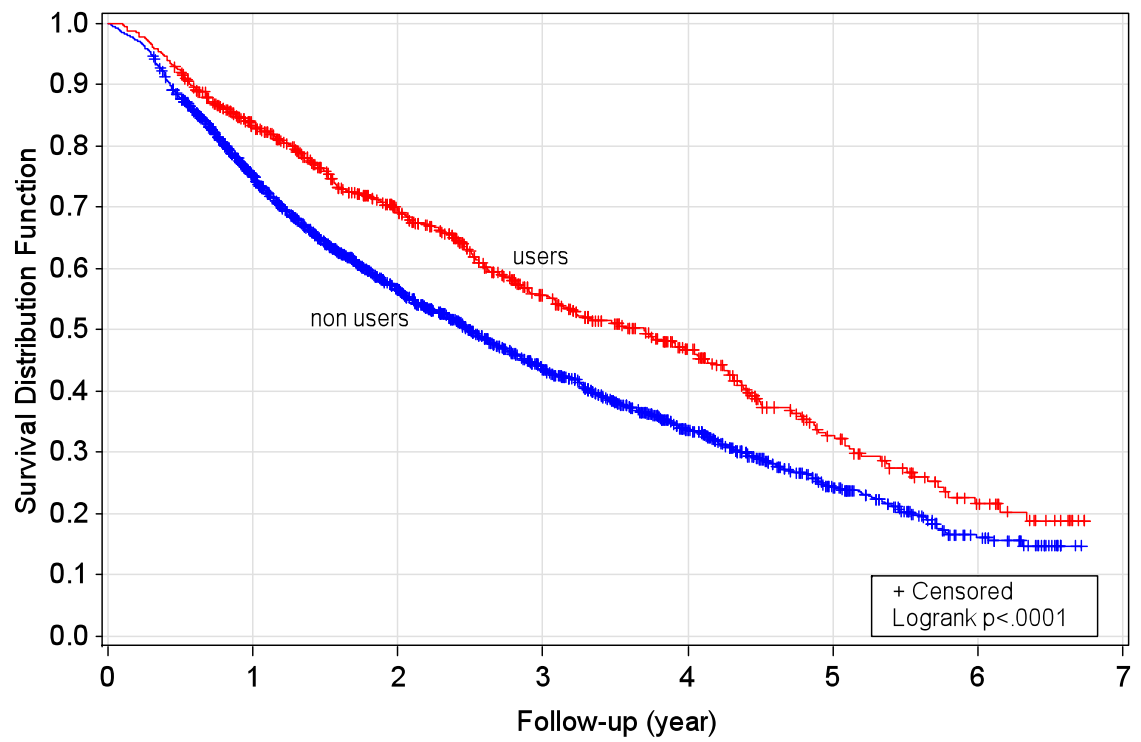


Figure 7. Kaplan-Meier curves of bladder cancer progression stratified by statin use.

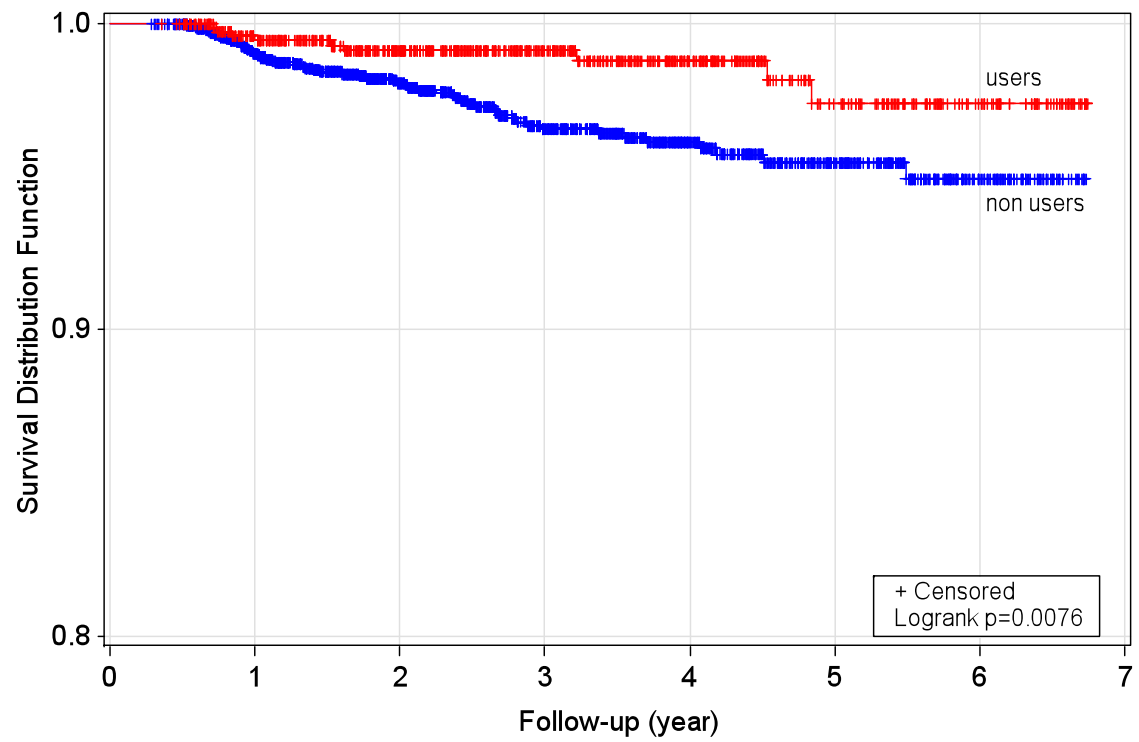


Figure 8. Kaplan-Meier curves of bladder cancer recurrence stratified by tertiles of statin use.

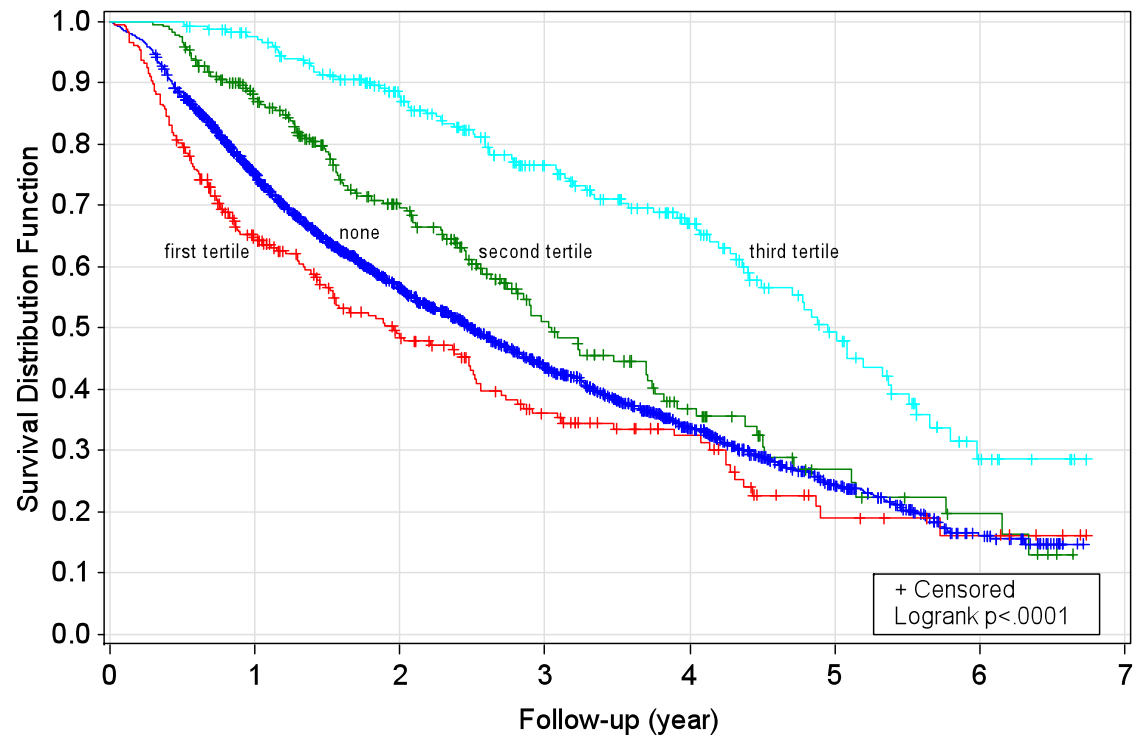
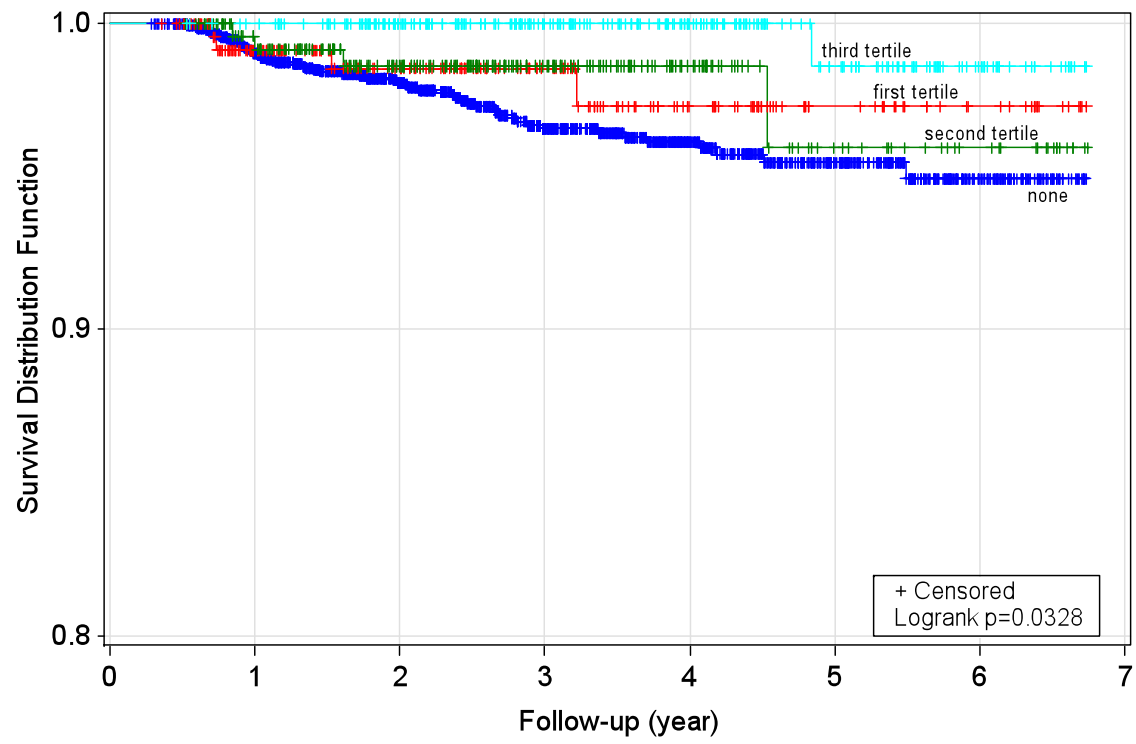


Figure 9. Kaplan-Meier curves of bladder cancer progression stratified by tertiles of statin use.



We used Cox proportional hazards models and verified the proportional hazards assumption. We modeled statin use as a time-fixed “ever statin user” exposure variable, which is confounded by immortal time. We present in Table 11 the results of the univariate, the age adjusted, and the multivariate adjusted time-fixed models. We then modeled statin use as a time dependent variable, using “has started statin use” in the model. In this approach, we considered statin users as exposed for the remaining of the follow-up time from the moment they filled their first prescription of statin. The corresponding association measures are presented in Table 12 for the different study outcomes. Of important note, the association between statin use and bladder cancer recurrence completely lost significance with this better modeling of statin use. The associations with cancer progression and death remained significant.

We then modeled statin use as an absolute time-dependent variable, using “current statin use” in the model. Here, patients become unexposed if and when their statin prescription ends. The exposure status may thus vary back and forth between the exposed and unexposed status. A non-compliant patient, as an example, who will delay the time of filling of his statin prescription will be considered unexposed to statin use from the date the preceding prescription ends until he fills his next prescription. The corresponding association measures are given in Table 13 for all study outcomes.

We then quantified exposure to statin in terms of cumulative ingested doses. To be able to more appropriately compare different dosage across different statin drugs we modeled an atorvastatin equivalent whereby the following doses were assumed to have a similar effect: atorvastatin 1 mg = cerivastatin 0.1 mg = simvastatin 2 mg = lovastatin 4 mg = pravastatin 6 mg = fluvastatin 8 mg.

We based our dose equivalent calculations on recent data from meta-analyses of the effect of statin use on cardiovascular outcomes^{436, 441, 442, 471} and were inspired by other principles about statin equivalence even for unexpected effects of statins.^{429, 444, 445} Based

on this cumulative dose of statin over follow-up time, we then categorized statin users into tertiles of total statin use.

Table 9. Distribution of person-time and bladder cancer recurrence events stratified by statin use – effect of correcting immortal time bias

	Statin Use			Non Statin Use			Rate Ratio [†]
	No. of		Rate*	No. of		Rate*	
	Person-years	Events		Person-years	events		
Biased analysis							
Immortal period	463.14	0		0	0		
At-risk period	1244.10	345		4434.67	1241		
Total	1707.24	345	20.21	4434.67	1241	27.98	0.72
Corrected analysis							
Immortal period	0	0		463.14	0		
At-risk period	1244.10	345		4434.67	1241		
Total	1244.10	345	27.73	4897.81	1241	25.34	1.09

* Rate per 100 persons-years

[†] Rate ratio obtained per simple division of rates

Table 10. Distribution of person-time and bladder cancer progression events stratified by statin use – effect of correcting immortal time bias

	Statin Use			Non Statin Use			Rate Ratio [†]
	No. of		Rate*	No. of		Rate*	
	Person-years	Events		Person-years	events		
Biased analysis							
Immortal period	647.39	0		0	0		
At-risk period	1706.76	9		5875.55	57		
Total	2354.15	9	0.38	5875.55	57	0.97	0.39
Corrected analysis							
Immortal period	0	0		647.39	0		
At-risk period	1706.76	9		5875.55	57		
Total	1706.76	9	0.53	6522.94	57	0.87	0.60

* Rate per 100 persons-years

[†] Rate ratio obtained per simple division of rates

Table 11. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-fixed statin exposure modelling approach

Time-fixed exposure model* for statin use during follow-up	Event recurrence			Event progression			Event death		
	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value
Statin univariate	0.72	(0.64 - 0.81)	<.0001	0.40	(0.20 - 0.80)	0.0100	0.37	(0.28 - 0.48)	<.0001
Statin univariate (stratification by age)	0.73	(0.65 - 0.83)	<.0001	0.30	(0.15 - 0.61)	0.0009	0.49	(0.38 - 0.65)	<.0001
Statin multivariate [†] (stratification by age and gender)	0.69	(0.60 – 0.78)	<.0001	0.24	(0.11 – 0.52)	0.0003	0.40	(0.30 – 0.53)	<.0001

* Cox models are adjusted for [†] age, gender, intravesical therapy, chronic disease score and and intravesical therapy

Table 12. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure remains constant once started.

Time-dependent exposure model* for statin use during follow-up	Event recurrence			Event progression			Event death		
	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value
Statin univariate	1.06	(0.94 - 1.20)	0.3288	0.59	(0.29 - 1.20)	0.1452	0.53	(0.41 - 0.69)	<.0001
Statin univariate (stratification by age)	1.10	(0.97 - 1.25)	0.1324	0.47	(0.23 - 0.95)	0.0363	0.72	(0.55 - 0.95)	0.0190
Statin multivariate [†] (stratification by age and gender)	1.10	(0.96 - 1.25)	0.1598	0.38	(0.18 - 0.84)	0.0160	0.57	(0.43 - 0.77)	0.0001

* Cox models are adjusted for [†] age, gender, intravesical therapy, chronic disease score and and intravesical therapy

Table 13. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using an absolute time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure status may vary between user and non user over time.

Time-dependent exposure model* for statin (days used) use during follow-up	Event recurrence			Event progression			Event death		
	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value
Statin (days used) univariate	1.03	(0.90 - 1.17)	0.6659	0.69	(0.33 - 1.44)	0.3168	0.17	(0.11 - 0.28)	<.0001
Statin (days used) univariate (stratification by age)	1.05	(0.92 - 1.20)	0.4834	0.56	(0.26 - 1.17)	0.1237	0.23	(0.14 - 0.38)	<.0001
Statin (days used) multivariate [†] (stratification by age and gender)	1.02	(0.89 - 1.18)	0.7735	0.45	(0.20 - 1.03)	0.0583	0.18	(0.11 - 0.30)	<.0001

* Cox models are adjusted for [†] age, gender, intravesical therapy, chronic disease score and intravesical therapy

Table 14. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where where statin exposure remains constant once started, and where statin users are categorized in tertiles of cumulative statin dose at end of follow-up.

Time-dependent exposure model for statin (tertiles of cumulative dose) use during follow-up (reference group = non users)	Event recurrence			Event progression			Event death		
	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value
Current Statin use; first tertile	2.74	(2.26 – 3.31)	<.0001	0.97	(0.34 - 2.76)	0.9519	1.47	(0.98 - 2.19)	0.0612
Current Statin use; second tertile	1.07	(0.87 - 1.32)	0.5029	0.50	(0.16 – 1.54)	0.2245	0.52	(0.32 – 0.82)	0.0055
Current Statin use; third tertile	0.49	(0.39 - 0.62)	<.0001	0.06	(0.01 - 0.57)	0.0134	0.25	(0.15 – 0.44)	<.0001

* Cox models are adjusted for [†] age, gender, intravesical therapy, chronic disease score and intravesical therapy

Table 15. Associations between statin use and bladder cancer evolution (recurrence, progression or death) using a time-dependent statin exposure modelling approach where statin exposure is cumulative over time.

Time-dependent exposure model* for statin (cumulative gr.) use during follow-up	Event recurrence			Event progression			Event death		
	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value	HR	(95% CI)	p-Value
Statin (cumulative gr.) univariate	1.01	(0.99 - 1.03)	0.2524	0.96	(0.84 - 1.09)	0.4982	0.94	(0.90 - 0.99)	0.0088
Statin (cumulative gr.) univariate (stratification by age)	1.01	(0.99 - 1.03)	0.1978	0.92	(0.80 - 1.06)	0.2692	0.98	(0.94 - 1.02)	0.3497
Statin (cumulative gr.) multivariate [†] (stratification by age and gender)	1.02	(1.00 - 1.04)	0.0805	0.87	(0.76 - 0.99)	0.0361	0.95	(0.91 - 1.00)	0.0471

* Cox models are adjusted for [†] age, gender, intravesical therapy, chronic disease score and and intravesical therapy

We present in Table 14, the results from Cox proportional hazards models where statin use was modeled as a time-dependent variable accounting for the immortal time before start of statin use. Also, individuals were categorized into tertiles of cumulative dosage for statin users. Thus at each failure time, the cumulative dose of statin up to that point in time was used to quantitatively quantify exposure in the risk set. The reference value is 0, i.e. non-users of statin up to that point in time. With this modeling strategy, individuals who stopped using statins carried their accumulated dose thereafter. The immortal time bias here is illustrated across groups whereby men that had a longer follow-up time without an event were at greater risk of being in the highest tertile of statin consumption. These measures of association are statistically significant but they are confounded by immortal time. Here, immortal time is a form of selection bias whereby patients selected in different groups are at different risks of having both the exposure to statin and risk of event. This creates the bias. To correct for that kind of problem, different methods of analysis may be used. One is to change the start of follow-up to a common time-point for everybody, restricting the measure of exposure before that time point. The other method, in which the variable is modeled continuously, is to only count ‘at risk’ the period of time in individuals once they reached the criteria for being included in the category of cumulative statin exposure. The problem, however, is that interpretation of such a variable modeled continuously is difficult. Indeed, patients may pass from one category of exposure to another category over time, but the reference group remains non-users.

Finally, the last method assumes a linear dose-response association between the amount of statin use and the risk of study outcome. We included the measure of cumulative statin dosage used described above directly in the model, as the time-dependent exposure variable. However, there is no further categorization of this variable into groups using indicators. We present the association measures in Table 15. This method shows that there is a dose response type of association whereby increasing statin consumption decreases the risk of bladder cancer recurrence and death. Here the association is not

confounded by immortal time, because men who were classified as non exposed indeed had not consumed any statin up to that point in time .

DISCUSSION

We have shown that immortal time bias is introduced by the use of a time fixed analysis in cohort studies with periods of immortal time. We have illustrated as well that immortal time bias is usually an information bias where exposure is misclassified for a certain period of time. It is not specific to pharmaco-epidemiological studies, as illustrated by many of the previously published cancer examples provided in this paper. This bias is quite prevalent in studies of cancer outcomes and it is important to keep this in mind when reading papers studying cancer outcomes.

We have also shown that immortal time bias may be a form of selection bias that happens when grouping individuals that have a different risk of both exposure and outcome event because of the varying time periods over which the groups are formed (Table 14). This more subtle form of the immortal time bias arises when these categories are created, even despite proper use of time-dependent modeling techniques. This last point emphasizes the importance of understanding the sometimes inconspicuous effects of time. Complex statistical modelling, such as illustrated by Zhou et al.⁴⁶⁵, must always be associated with a careful epidemiological reasoning.

Such reasoning must carefully examine the time-exposure relationship. The simple dichotomous (time-dependent until start of drug use) definition of statin users in the time-dependent analyses can result in residual misclassification of treatment status. This assumes that individuals are treated for the remainder of their follow-up once they started using statin. As described earlier, some individuals may have stopped using statin for a period of time or definitely. This may result in having later events potentially incorrectly attributed to statin use rather than to statin non use. The long duration of follow-up in our study may have accentuated the effect of this differential misclassification. This is the reason why we present a more granular measurement of exposure based on a daily usage of

statin (fully time-dependent). However, the true nature of the biological effect of statin use on bladder cancer is really unknown and was the true objective of our initial study. It is tempting to assume that the anticancer effect of statins would take a longer period of time before being effective. Thus, the more granular definition of exposure to statins on a daily basis may not be the best exposure measurement that would be reflective of the underlying biological mechanisms. Indeed, an individual who stopped using a statin on the day before, is considered unexposed in the following risk set at the following failure time. The cumulative statin exposure definition may better reflect activity of the drug at the cellular level in terms of preventing cancer recurrence or progression.

The lack of long-term biological measures about statin effects on cancer precludes a robust conclusion about which modeling approach best fits the biological effect. However, comparison with the more studied cardiovascular outcomes is worthwhile. Authors from the Netherlands reported a comparison of two methodologies to analyze exposure to statins in an observational study on effectiveness.⁴⁷² They concluded that, compared to a definition of statin exposure based on baseline data only (time-fixed at study entry), using time-dependent exposure definition of statin use based on pharmacy medico-administrative data was more appropriate as it mirrored more closely results from randomized clinical trials. However, the authors modeled statin exposure as follows: “We created time-dependent categorical variables by dividing cumulative use of statins during the study period into three mutually exclusive categories: non-use, 24 or fewer months of cumulative use (...) and more than 24 months of cumulative use (...)”. They found a variable effect of statin use. The multivariable adjusted relative risk between statin use and risk of myocardial infarction and stroke suggested an increased risk before 2 years ($RR=1.35$; $95\%CI=0.90-2.02$) and a decreased risk after 2 years ($RR=0.63$; $95\%CI=0.34-1.15$). These measures are confounded by the more subtle form of immortal-time bias, when it is a form of selection bias. Indeed, patients selected in different groups are at different risks of having both the exposure to statin and risk of event. The patient under a statin drug for a total duration of 2 years or less is likely to have a short follow-up possibly because of a study outcome occurred. Strikingly, this is also what we observed in our bladder cancer cohort when we

modeled a similar exposure definition to that used in the dutch study (Table 14). Statin users in the first cumulative time-dependent tertile were at greater risk of bladder cancer recurrence and death than non-users, but the statin effect became increasingly protective with cumulative dose tertiles.

Immortal time must be considered at all stages of conduct of a study. First, at the design stage, cohorts have to include all follow-up time, including that before the start of exposure. This allows the quantification of the actual immortal person-time in relation to the specific definition of exposure selected. Second, at the analysis stage one needs to correctly classify immortal time in terms of exposure. Time-dependent analyses must be used. This may be done using simple person-time methods as suggested originally by Suissa⁴⁵⁹ or using more sophisticated techniques such as Cox proportional hazards models with time-dependent exposures. When using more complex statistical modeling techniques, one always needs to keep in mind how time may distort the association measures, especially when categories of exposure are made from data available at the end of follow-up. Suissa⁴⁵² also highlights another methodological point about these advanced modeling techniques: they assume that initiation and interruption of treatment are subject to random censoring. If this is not the case then approaches such as inverse probability of censoring weighting can be considered.⁴⁷³

CONCLUSION

Immortal time bias is frequently observed in cohort studies of cancer outcomes. This bias will tend to spuriously decrease the measured risk ratio of the exposure. The potentially detrimental impact of such bias findings on clinical practice and health policy may be dramatic by promoting the use of potentially ineffective or even detrimental therapies or interventions. All cohort studies should be assessed for the presence of this subtle bias.

3. Discussion

3.1. Lipides et cancers urologiques – hypothèses communes?

Nos résultats suggèrent qu'une diète riche en acides-gras oméga-3 d'origine marine a un effet bénéfique sur le développement et la progression du cancer de la prostate³⁴⁹. De plus, la variation génétique dans la protéine *COX2*, une enzyme importante impliquée dans le métabolisme des acides gras, modifie l'effet observé des oméga-3. Ainsi, il semble que cette enzyme (*COX2*) et la cascade inflammatoire sont impliqués dans la carcinogenèse prostatique. Comme une abondante quantité de données biologiques supporte cette hypothèse, cette interaction renforce l'association inverse entre une diète riche en acides gras oméga-3 d'origine marine et le risque de développement et de progression du cancer de la prostate.

Il semble également que le sous-type de lipides a un effet plus important que les graisses en général dans la carcinogenèse prostatique. Notons toutefois que les lipides d'origine animale (graisse saturée et graisse trans) semblent avoir un effet néfaste sur le risque d'apparition du cancer de la prostate⁸⁷, ainsi que sur sa progression³⁵⁰.

Tel que relevé dans l'introduction, les données à propos de l'effet de la diète sur le risque de cancer de la vessie sont beaucoup moindres²⁹¹. Une tendance globale similaire avec l'effet de la diète sur l'incidence du cancer de la prostate semble avoir été notée. Il n'y a cependant pas d'étude ayant examiné les sous-types de lipides en lien avec le cancer de la vessie.

Le cancer de la vessie était le sujet de notre deuxième étude, dans laquelle nous avons décrit l'effet des statines sur l'évolution du cancer superficiel de la vessie. Notre étude est unique en ce qu'elle est la première qui étudie cette population de cancer superficiel de la vessie dès le traitement initial. Notre étude est aussi la première qui démontre un effet protecteur des statines, d'une manière significative, sur l'évolution du cancer de la vessie. Tel que décrit dans l'article, une vague d'études très récemment publiées commencent à explorer le rôle des statines sur la récurrence des cancers : en ce qui

concerne le cancer de la prostate, trois études^{428, 429, 474}, entre autres, montrent un effet bénéfique de l'utilisation des statines.

Les points de rapprochement entre les deux cancers urologiques étudiés dans la présente thèse sont donc plus faciles à faire quant à l'effet de la statine sur la récurrence après traitement initial. Par contre, les données disponibles sont très limitées quant à l'effet de la statine sur le risque de développer les deux types de cancers, particulièrement en ce qui concerne le cancer de la vessie. Il semble, toutefois, exister un effet protecteur sur l'apparition du cancer de la prostate, surtout agressif.⁴⁷⁵ À noter qu'il persiste à ce sujet une controverse importante. Plusieurs biais ont été mis de l'avant pour expliquer la contradiction dans les résultats observés, particulièrement pour le cancer de la prostate. En effet, il semble que les statines diminuent le taux d'antigène prostatique sérique^{476, 477}, ce qui pourrait induire un biais de détection de ce type de cancer. Tel que décrit précédemment, le taux d'APS est utilisé pour dépister le cancer de la prostate. Un cholestérol sérique bas est également associé à un plus faible risque de cancer de haut grade de la prostate⁴⁷⁸. Ceci suggère que, d'un point de vue biologique, la cascade du cholestérol pourrait être impliquée sinon dans la possibilité de détecter le cancer de la prostate, alors dans la carcinogenèse prostatique.

Comme les statines diminuent le cholestérol sanguin, il est naturel de penser que ceci peut entraîner une inhibition de la croissance tumorale. Ceci est en effet observé dans différents modèles cellulaires de cancers. Toutefois, les statines ont des effets plus puissants sur la prolifération cellulaire et sur la mort cellulaire que le cholestérol ne peut en avoir³⁸⁰. En effet, la panoplie de cascades cellulaires altérées par les statines qui peuvent avoir un effet anti-cancer est impressionnante. Et bien qu'il y ait une différence importante entre les facteurs de risque de développement du cancer ainsi que ceux de la progression, certains mécanismes biologiques sont différents, mais plusieurs sont tout de même similaires.

Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse qu'il pourrait y avoir une interaction entre les acides gras oméga-3 (diététiques), le taux de cholestérol sérique et les agents qui le

modifient tel que la statine. En cancer, il y a très peu, voire aucune donnée expérimentale ou observationnelle qui supporte cette interaction. Toutefois, nous pouvons nous appuyer sur les données disponibles en maladies cardiovasculaires afin de générer notre hypothèse.

En effet, l'effet synergétique ou interactif des omégas-3 (diététiques) et des statines est suspecté depuis longtemps dans les maladies cardiovasculaires. Des essais cliniques randomisés contrôlés ont été publiés démontrant l'utilité de suppléments d'oméga-3 d'origine marine combinés au traitement par statines chez des patients présentant des dyslipidémies combinées, telles qu'une hypertriglycémie et une hyperlipidémie⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹. Les omégas-3 d'origine marine sont aussi efficaces pour améliorer le traitement déjà établi de la dyslipidémie diabétique⁴⁸². L'ajout d'oméga-3 d'origine marine au traitement en cours améliore le profil lipidique et fait diminuer le LDL cholestérol et les autres sous-groupes de mauvais cholestérol^{483, 484}. Ce lien entre oméga-3 (diététique) et cholestérol est connu depuis environ deux décades déjà⁴⁸⁵ mais est maintenant prouvé dans des populations cibles.

L'autre hypothèse rejoignant les omégas-3 (diététiques) et les statines est celle de l'inflammation. En effet, l'utilisation de statines réduit les biomarqueurs de l'inflammation. On sait aussi que des biomarqueurs inflammatoires tels que la protéine C réactive, présente une association positive avec le risque de maladies cardiovasculaires⁴⁸⁶. Tel que démontré dans le premier article scientifique de la présente thèse, l'évidence supportant un rôle anti-inflammatoire des acides gras oméga-3 d'origine marine est de plus en plus abondante. Il est possible que la voie globale associant les lipides ainsi que leur métabolisme aux cancers urologiques, et peut-être même aux cancers en général, passe par la cascade inflammatoire. Il est vrai que l'étude des effets pléiotropiques des statines sur la biologie des maladies cardiovasculaires est plus facile à étudier que sur le cancer parce que, contrairement aux maladies cardiovasculaires, il y a peu de marqueurs intermédiaires mesurables importants en oncologie.⁴⁸⁷ Qui plus est, l'association entre les différents marqueurs dont nous discutons présentement, soit les marqueurs de l'inflammation ou les marqueurs lipidiques, n'ont pas d'association franche avec l'incidence ou la progression

des cancers. Ceci renforce l'importance de la recherche en développement de biomarqueurs valides en cancer.

Plusieurs voies communes hypothétiques sont proposées, basées sur des données observationnelles et expérimentales existantes, et pourraient expliquer les effets observés en cancer de la prostate et en cancer de la vessie dans les études de la présente thèse. Le message à retenir demeure toutefois celui qu'une recherche plus abondante est nécessaire tant sur le plan biologique que sur le plan épidémiologique afin de mieux comprendre les effets réels des lipides sur les cancers chez l'humain ainsi que les mécanismes biologiques qui les sous-tendent.

3.2. Rétrospection critique des articles

L'objectif de la présente section est de compléter la discussion des trois articles centraux de cette thèse. J'insisterai à la fois sur les points communs de ces études et porterai une attention particulière à certains points d'intérêt particulier.

3.2.1. Forces et faiblesses des études présentées

Les études présentées dans cette thèse ont des forces respectives qui ont été soulevées dans chacun des articles. Les forces communes sont que les devis d'études étaient bien conçus et qu'ils étaient bien analysés. Les tailles d'échantillon de chacune des études étaient bonnes permettant une mesure suffisamment précise des effets.

L'étude du cancer de la prostate ayant utilisé un devis cas-témoins présente des avantages particuliers. Ce devis permet d'étudier de multiples facteurs d'exposition en relation avec une issue bien définie qu'est le cancer agressif de la prostate. C'est exactement ce que l'équipe du Dr Witte a fait avec brio. Aussi, nous avons utilisé une approche nutri-génétique, permettant d'approfondir, sur une base de population humaine, les mécanismes biologiques qui sous-tendent les associations observées et possiblement aussi d'expliquer des variations observées dans la littérature précédemment publiée. En

effet il est tentant d'émettre l'hypothèse qu'une partie significative de la variabilité des études épidémiologiques portant sur l'effet controversé des lipides de la diète sur le cancer de la prostate peut être expliquée par la confusion par le génotype. L'approche nutrigénétique permet le contrôle (théorique) de la variabilité des effets biologiques des nutriments sur l'humain étant donnée que le métabolisme de ces substances et la physiologie humaine peut varier grandement en fonction du génotype individuel pouvant affecter la fonction des enzymes.

D'autre part, l'étude portant sur l'effet des statines sur l'évolution du cancer de la vessie présente un avantage particulier : il est basé sur des données populationnelles. De telles données permettent d'étudier l'efficacité (*effectiveness*) d'interventions dans la « vraie vie », sur le terrain, dans des circonstances normales. Ceci est un concept important dont Cochrane en a fait la promotion dès 1972.⁴⁸⁸ Cette question est peut-être même plus importante que celle de l'utilité (*efficacy*), qui est la mesure dans laquelle une intervention produit un résultat bénéfique dans des conditions expérimentales. Ce type de données facilite aussi la généralisabilité des trouvailles à l'ensemble de la population traitée qui peut être bien différente de celle des essais cliniques randomisés contrôlés. Un bémol avec les données de la RAMQ est toutefois la surreprésentation des personnes âgées de plus de 65 ans, qui sont presque toutes éligibles au régime de couverture médicamenteuse, contrastant avec une plus faible proportion de la population de moins de 65 ans. Ceci est moins problématique pour le cancer de la vessie qui est associé avec l'âge et survient le plus souvent après 65 ans.

Toutefois, ces études ont aussi des faiblesses en commun. Les deux devis d'études étaient rétrospectifs. En particulier, l'étude cas-témoins est sujette à un biais de mémoire non négligeable, bien que des sous-analyses conduites dans notre étude ainsi que la temporalité de l'étude nous suggèrent que ce biais n'expliquait pas l'effet observé.

L'étude sur le cancer de la vessie était basée sur des banques de données administratives. En ce sens, un biais d'information est possiblement sous-jacent. Toutefois, celui-ci devrait être non différentiel et nous laisse croire que l'association réelle,

respectivement à ce biais, est au moins aussi forte que celle observée. Nous avons discuté du biais d'indication, le talon d'Achille des études pharmaco-épidémiologiques, et des raisons pour lesquelles nous croyons qu'il n'explique pas l'effet protecteur observé des statines. Toutefois, le plus grand questionnement quant à cette étude demeure la possibilité de confusion par des facteurs non mesurés tels que le tabagisme, l'histologie tumorale ou autres.

Enfin, un biais commun à ces études rétrospectives qui évaluent des interventions pouvant être associées au style de vie, est le biais de sélection pronostique. En effet, les individus qui suivent les recommandations et qui utilisent les statines, de même, ceux qui consomment une diète plus saine, et donc une quantité d'acides gras oméga-3 d'origine marine plus grande, sont plus à risque d'avoir des habitudes de vie plus saines et d'être plus conscients de l'importance de la santé et possiblement de chercher à obtenir des meilleurs soins que les patients ne présentant pas ces caractéristiques de leurs habitudes de vie. Autrement dit, l'effet « bon patient » pourrait être confondant dans les deux études présentées.

3.2.2. Regard épidémiologique sur la carcinogénèse

D'abord, portons un regard critique sur certaines notions épidémiologiques pertinentes aux articles présentés. En général, en épidémiologie du cancer, les causes sont évidemment partielles—*component causes*, telle que proposées dans *Modern Epidemiology*⁴⁸⁹—dans un processus causal nommé 'complexe', i.e. multifactoriel, et avec une séquence temporelle de cascade d'expositions potentiellement causales tout aussi complexe. En effet, presque aucun cancer n'est déclenché que par une seule cause. Toutefois, un exemple d'exception notable à cette affirmation est un cancer hématologique, la leucémie myéloïde chronique (LMC). Il y a un peu plus d'une décennie, le mécanisme de cette maladie a été élucidé, rendant le mécanisme causal de cette condition très simple—parce que virtuellement unique. Une mutation génétique, la fusion entre le chromosome 9 et 22, cause un gène bcr-

abl dysfonctionnel et entraîne une prolifération cellulaire hématologique potentiellement mortelle. Son histoire est même plus belle encore : une thérapie spécifique a été développée, soit l'imatinib (Gleevec), ciblant la protéine de fusion (bcr-abl) anormale existant seulement dans les cellules leucémiques. L'imatinib est devenu l'exemple canonique de la thérapie moléculaire ciblée, aujourd'hui un champ de recherche très actif pour plusieurs types de cancers, dont le cancer du rein en urologie. Par ailleurs, possiblement parce que la biologie des autres cancers n'a pas été élucidée aussi clairement, ou parce que leur biologie est réellement complexe, presque tous les cancers ont des mécanismes causaux dits complexes en épidémiologie. Leur séquence temporelle est aussi complexe.

Les causes qui agissent précocement et tardivement dans le mécanisme causal, peuvent être nommées respectivement comme des agents d'initiation et de promotion du cancer. Le cancer de la prostate, étudié dans le premier article des résultats de la présente thèse, est un exemple typique de cancer communément dit avec une grande phase de latence. Cette considération populaire, toutefois est à l'origine de plusieurs problèmes en recherche. En fait, ce n'est pas la maladie elle-même qui a une longue phase de latence, mais plutôt la relation cause-maladie qui peuvent avoir des périodes de latence (ou induction, voir plus bas) plus ou moins longues. En effet, le dernier facteur d'exposition causal de la cascade, qui déclenche la maladie, aura une période de latence nulle, même dans un cancer avec longue période de latence. Cette mauvaise compréhension, ou emphase d'un concept temporel mise au mauvais endroit, peut aveugler certains gens et entraîner une ignorance d'évidences à propos d'effets étiologiques qui surviennent relativement tardivement dans le processus culminant au diagnostic clinique de certains cancers. À l'inverse, il est très difficile d'étudier des maladies dont la relation cause-maladie est très longue. L'exemple du diéthylstilbestrol est frappant, avec une période de 15 à 30 ans. À partir des années 1940, plusieurs femmes ont été exposées à cette substance parce que la croyance de l'époque était qu'elle menait à un plus faible taux de complications obstétricales. Pourtant, ce n'est que dans les années 1970 que l'association

cause-maladie a été découverte : une forme rare de cancer du vagin survenant chez les jeunes femmes découlait de l'exposition *in utero* au diethylstilbestrol.

Les étapes primitives de la carcinogénèse peuvent toutefois être plus précisément conceptualisées en une période d'induction et une autre de latence. La période d'induction peut se définir comme la période de temps de l'action causale jusqu'à l'initiation (occurrence) de la maladie; la période de latence, la période de temps de l'occurrence irréversible de la maladie jusqu'à la détection clinique. Une fois le cancer initié, réellement déclenché, il ne sera pas nécessairement manifeste, et le plus souvent pas. La période d'induction de la maladie est fixe et dépend de la biologie de la tumeur, de la génétique de l'individu et des facteurs d'exposition environnants. Par contre, la période de latence peut être réduite par un diagnostic plus précoce de la maladie, conséquemment à un test de dépistage, par exemple. C'est le concept du temps d'avance au diagnostic (*lead time*) qui peut biaiser les études évaluant les bénéfices potentiels du dépistage du cancer.

L'article portant sur le cancer de la prostate (présenté au chapitre 2.1.) illustre bien la pertinence de plusieurs points discutés dans la présente section. D'abord, cette étude présente le lien entre un facteur nutritionnel (oméga-3) et l'incidence du cancer de la prostate. Il est généralement pensé qu'une très longue phase de latence doit exister entre la diète et le diagnostic d'un cancer de la prostate. Aussi, une telle exposition (diète) doit être soutenue pour qu'une si simple—ou banale—exposition puisse causer un cancer. Ici, plusieurs points méritent mention : d'abord, le type de mesure de l'exposition diététique utilisé dans l'article, puis une discussion sur la nécessité (ou non) d'une exposition si prolongée.

En prenant pour acquis que la prémisse d'une longue association entre l'incidence du cancer de la prostate et la diète est nécessaire et vraie, discutons du type de mesure d'exposition dans cette étude (chapitre 2.1.). Le questionnaire semi-quantitatif de fréquence utilisé pour mesurer la consommation alimentaire *sur la dernière année*. Ceci est probablement le reflet de l'alimentation ingérée sur une très longue période de temps, plusieurs années. Plusieurs questionnaires utilisés par d'autres groupes de recherche

mesurent la consommation alimentaire sur des périodes plus courtes, pouvant introduire d'autres variations telles que l'alimentation saisonnière, par exemple. À l'extrême, des mesures telles que les rappels des derniers 24 heures ou un journal alimentaire complet sur quelques jours, bien que très précises pour la période évaluée, présentent une variation très élevée dans le temps et ne peuvent pas être représentatives d'une alimentation sur une longue période. Par contre, lorsque répétées fréquemment, ces mesures peuvent donner un portrait très précis de l'alimentation sur une longue période. Les études utilisant ce type de mesures sont toutefois très rares, parce que très difficiles à mettre en place. Un exemple récent, utilisant une telle stratégie, est la cohorte longitudinale NuAge. Cette étude prospective, dans laquelle plusieurs mesures sociales, médicales et épidémiologiques sont aussi prises sur une base répétée, porte sur la nutrition comme déterminant d'un vieillissement réussi. Aucune mesure en cancer n'a toutefois été décrite encore dans cette cohorte avec un suivi prospectif encore peu mature.

Maintenant, remettons en question la nécessité de longue période temporelle entre le lien diète - cancer de la prostate. Celui-ci pourrait être aussi être relativement court : les oméga-3 pourraient être un des derniers éléments de la cascade causale du cancer de la prostate, agissant sur la promotion de ce cancer. En effet, il est peu probable que la diète agisse comme un des éléments causaux précoces de ce cancer. Ceux-ci sont classiquement plutôt des variantes génétiques innées ou acquises. Ces dernières peuvent être soit spontanées, affectant alors initialement une très petite quantité de cellules, survenant lors de la division cellulaire et causant l'apparition de clones qui se multiplieront rapidement et entraîneront la tumeur; soit déclenchées par des effets toxiques, qui affecteront alors une très large quantité cellulaire—voir tout l'organisme, ou tout l'organe riche en certaines toxines spécifiques—telles que la méthylation de l'ADN. Rappelons l'hypothèse sous-jacente à l'étude (toujours chapitre 2.1.) portant sur le cancer de la prostate : les oméga-3 inhibent l'inflammation qui garde le cancer en phase de latence ou dormant. À l'inverse, une faible ingestion d'oméga-3 crée un milieu pro-inflammatoire et déclenche la promotion du cancer ou son réveil. L'association avec une forme de cancer plus agressive, comme observée dans cet article—et d'autres, tel que revu au chapitre 1.3.2. portant sur les lipides

et le cancer de la prostate—fait d’ailleurs penser à ce que la diète puisse réellement être un facteur déclenchant ou favorisant la promotion du cancer vers une forme plus agressive, et éventuellement avancée, pouvant causer le décès, tel qu’observé par d’autres chercheurs. En contrepartie, les oméga-3 de la diète ne semblent pas associés avec l’incidence de cancer de toute cause qui est constituée majoritairement de cancers de bas grade, ayant un moindre potentiel d’agressivité. L’hypothèse ici est donc que les oméga-3 agissent comme facteur catalyseur de promotion du cancer à faible potentiel de malignité vers un cancer à haut potentiel de malignité. Et, dans un certain sens, un facteur catalyseur d’un état d’agressivité plus élevé ou de progression rapide, doit être considéré comme une cause du cancer en soi. Ceci est à tout le moins soutenu par plusieurs épidémiologistes réputés.⁴⁸⁹

Cette discussion sur la causalité peut être aussi appliquée au cancer de la vessie. L’article portant sur le cancer de la vessie suggère que le métabolisme lipidique joue un rôle dans l’évolution de cette condition et surtout suggère que le traitement avec des statines puisse affecter favorablement l’évolution après traitement initial de cette condition. La structure des données utilisées pour cet article, centrée sur l’évolution après un premier traitement initial, et telle qu’elle ne permet pas d’étudier les mécanismes d’initiation du cancer *superficiel* de la vessie. Cet article suggère par contre que les statines pourraient inhiber la progression du cancer vers des formes plus agressives telles que le cancer *infiltrant* de la vessie, qui nécessite une cystectomie radicale, ou pouvant entraîner le décès. Un parallèle intéressant peut donc être fait entre les différents niveaux d’agressivité du cancer de la vessie et ceux discutés précédemment en cancer de la prostate. L’utilisation de statines pourraient donc être un facteur de prévention du cancer infiltrant ou agressif de la vessie (pouvant mener au décès). L’utilisation de statines pourrait donc être considérée comme un facteur causal (ou préventif) de la promotion du cancer de la vessie vers un stade plus avancé ou agressif.

Via l’angle de la promotion du cancer, une comparaison des deux devis d’études utilisés dans la présente thèse est intéressante à faire. Bien que nous ayons utilisé un devis d’étude de cohorte pour identifier l’effet des statines, nous pouvons identifier les effets de

certaines facteurs sur un état de maladie agressive ou avancée (allant même jusqu'au décès dans ce cas-ci) de la même façon que nous avons identifié les effets de certains facteurs sur un état agressif de cancer de la prostate. Dans le cas du cancer de la vessie, il a été choisi d'identifier un stade précoce (tumeur superficielle) par des codes d'actes diagnostics et avec des approches de restriction. Dans un second temps, les événements de progression ont été identifiés, puis les mesures d'association calculées. Dans le cas du cancer de la prostate, les cas plus agressifs de la maladie au moment du diagnostic ont été sélectionnés et comparés avec des cas contrôles n'ayant pas la maladie. Ces facteurs ne sont pas prédictifs de l'évolution après traitement, mais plutôt d'une condition cancéreuse agressive versus l'absence de cette condition. Ceci inclut les concepts précoces de la carcinogénèse que sont l'initiation et la promotion. Après réflexion, les facteurs identifiés déclenchent probablement la promotion du cancer, bien que ceci demeure hypothétique. Ainsi, malgré l'utilisation de deux devis d'étude différents, nous touchons à des facteurs causaux communs.

3.3. Ma programmation de recherche future

Appuyé sur ces études, j'ai déjà débuté à mettre en place ma programmation de recherche future qui contribuera, je le souhaite, à approfondir nos connaissances sur l'effet des lipides sur les cancers urologiques.

Afin de mieux mesurer les variables confondantes d'intérêt, les études de terrain revêtent une importance capitale. Je propose une étude prospective de l'utilisation des médicaments et des facteurs diététiques mesurés par questionnaires semi-quantitatifs de fréquence alimentaires et par biomarqueurs reflétant l'ingestion de différents facteurs diététiques, chez les patients que nous traitons dans notre centre hospitalier. L'intérêt de ce type de recherche est grandissant dans la communauté urologique et déjà d'autres centres, incluant les Centres hospitaliers Universitaire de McGill et de l'Université de Montréal, ont déjà manifesté leur intérêt dans cette collaboration. Ceci permettra de mieux comprendre

les facteurs étiologiques et biologiques reliant les lipides aux cancers urologiques les plus communs.

Toutefois, afin de contrôler les biais typiques des études étiologiques observationnelles, l'essai clinique randomisé contrôlé de différentes interventions demeure le devis d'étude privilégié. En effet, l'assignation aléatoire de l'intervention permet de distribuer les facteurs potentiellement confondants au hasard de manière équilibrée entre les deux groupes. Par contre, un des facteurs limitant importants dans la conduite de ces essais cliniques, est la capacité de recruter les patients ciblés. J'ai la chance de m'installer dans un groupe de recherche très actif et de bénéficier de conseils précieux de mes mentors afin d'utiliser les infrastructures collaboratives de recherche déjà mises en place. Le Groupe d'urologie-oncologie canadien (CUOG) ainsi que le Consortium canadien de recherche en urologie (CURC) sont des associations liées à l'Association canadienne d'urologie qui ont pour mission de faciliter la recherche clinique en général, mais en particulier les essais cliniques. Ces associations ont pour but de faciliter la collaboration entre urologues, chercheurs et partenaires tels que l'industrie pharmaceutique dans la mise en œuvre d'études cliniques. Évidemment, ces études devront être financés par des organismes indépendants gouvernementaux tels que les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et l'Institut de recherche de la Société canadienne du cancer (IRSCC), le nouvel organisme remplaçant l'ancien Institut national du Cancer du Canada (INCC).

En assumant que nos résultats à propos des statines seront validés, un des premiers essais randomisés contrôlés multicentriques que je compte mettre en place à moyen terme sera orienté vers la mesure de l'effet des statines sur le risque de récurrence, et de progression du cancer de la vessie superficielle. Les statines pourraient en effet s'avérer être une des médications les plus intéressantes à tester étant donné leur profil d'innocuité. D'ailleurs, les lignes directrices cardiovasculaires tendant vers une visée de LDL-cholesterol de plus en plus bas, de plus en plus de patients utilisent déjà des statines. Ceci pourrait représenter une difficulté majeure de l'essai que je propose, entravant notre capacité de recrutement. Une solution alterne serait d'étudier de fortes doses de statines étant donné que nos résultats

suggèrent que l'effet anti-cancer sur la vessie semble dose dépendant. D'autres défis majeurs sont posés par une telle étude randomisée. Cette population avec cholestérol normal n'a théoriquement pas d'indication de statine par ailleurs. Ceci nécessitera une très bonne justification éthique qui pourrait être basée sur nos résultats. Comme dans tous les essais cliniques testant une intervention médicamenteuse, les problèmes du médicament et de la dose à tester seront critiques. Celle-ci devra être choisie après une revue en profondeur des doses typiques à partir desquelles les effets secondaires des statines sont surtout rencontrés. Le profil d'effets secondaires aidera certainement à identifier le médicament le plus pertinent à étudier. Toutefois une considération sur la lipophilicité de la statine choisie sera pertinente. En effet, bien que nos données ne pouvaient pas le démontrer probablement faute de puissance statistique pour des petits sous-groupes, d'autres études suggèrent que les statines lipophiles, par leur capacité à diffuser plus librement dans tout type de cellule, ont un effet anti-cancer plus marqué. Enfin, cet essai clinique randomisé devrait être centré sur des issues solides d'importance clinique majeure. La progression tumorale nécessitant une cystectomie radicale est une issue clinique très importante et moins fréquente que la récurrence tumorale, tel qu'illustré par nos données. L'issue progression permettra amplement de puissance statistique pour évaluer l'effet de la statine sur la récurrence tumorale, ou l'absence d'effet, tel que suggéré par nos données. Enfin, les coûts d'une telle étude sont majeurs malgré l'apparition sur le marché de plusieurs statines génériques. Une telle étude ne présente pas le potentiel d'être financé par l'industrie pharmaceutique et devra donc être financé par des organismes gouvernementaux ou des fondations, tel que décrits précédemment.

Éventuellement, je proposerai un autre essai clinique randomisé contrôlé pour évaluer l'effet protecteur des statines sur le risque de développer un cancer de la prostate après une première série de biopsies prostatiques négatives. En effet, ces hommes présentent tout de même une chance sur trois de voir un cancer de la prostate diagnostiqué subséquentement. Qui plus est, ils sont référés, ce qui présente une opportunité de recrutement.

L'identification de la population cible la plus pertinente à l'étude demeure un des facteurs les plus importants. En effet, des études de prévention du cancer en première ligne seront de plus en plus difficiles. D'une manière idéale et en utilisant un approche de santé publique, l'essai randomisé contrôlé parfait viserait à définir l'effet sur la mortalité d'une intervention préventive du cancer. Il est utopique de penser que ceci soit réalisable. Il y a un consensus général qu'il est très peu probable que, dans un futur accessible, des essais randomisés contrôlés explorent le potentiel de quelque agent de réduire la mortalité par cancer de la prostate chez l'homme. Une étude devrait recruter environ 100,000 sujets pour être valide et prendrait au moins deux décennies à être complétée^{490, 491}. Pour cette raison, les études sur l'incidence du cancer sont plus attrayantes, surtout si elles sont ciblées sur des populations à risque, telles que les hommes ayant déjà subi une biopsie de la prostate ou ayant d'autres facteurs de risque significatifs tels qu'une histoire familiale ou quelques autres facteurs de risques génétiques. En cancer de la vessie, il est possible d'identifier les individus à risque : les fumeurs, les travailleurs de l'aluminerie ou d'autres industries à risque, les gens ayant eu de la radiothérapie pelvienne, etc... Cibler ces populations à risque augmentera la puissance de ces études et rendra les tailles d'échantillon plus raisonnables.

Une première approche que je suis déjà en train de mettre en place est de conduire des essais cliniques de phase II. Ces essais vont permettre d'estimer les effets cliniques des interventions à l'étude et de quantifier la variabilité des différents paramètres d'intérêt, permettant de planifier un essai clinique de phase III. Un essai clinique de phase II, joint de manière appropriée à la création d'une biobanque de qualité, permet aussi d'étudier la biologie des mécanismes causaux du cancer, ainsi que des mécanismes qui sous-tendent les différentes interventions à l'étude. C'est exactement ce pourquoi j'ai eu la chance d'être financé. La programmation de recherche que je suis en train d'établir porte en effet sur les différentes interventions médicamenteuses et diététiques pour prévenir les cancers de la vessie et de la prostate ou pour en réduire leur progression.

4. Conclusion

Les lipides semblent avoir un effet sur les cancers urologiques les plus communs. Ils semblent aussi agir dans la même direction en ce que un meilleur profil lipidique semble être un facteur protecteur. Plus spécifiquement, une diète riche en acides gras oméga-3 d'origine marine semble réduire le risque de cancer de la prostate agressif. Aussi, l'utilisation de statines semble réduire la progression du cancer superficiel de la vessie après traitement chirurgical initial. Nous ne savons pas pour le moment si cet effet passe par une amélioration du profil de cholestérol sérique des patients traités par statines ou si les effets anti-prolifératifs suggérés aux statines expliquent plutôt cette association. D'autres études épidémiologiques et biologiques sont nécessaires et justifiées afin de mieux définir ces associations et mieux comprendre les mécanismes qui les sous-tendent. Ceci est d'autant plus vrai que l'attrait pour ces potentielles interventions préventives en termes de santé publique est grand, compte tenu de leur innocuité.

5. Bibliographie

1. Canadian Cancer Society's Steering Committee: Canadian Cancer Statistics 2009. Toronto: Canadian Cancer Society. ISSN 0835-2976. 2009.
2. Society. AC. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2005. . American Cancer Society, Atlanta 2005.
3. Godley PA, Schenck AP, Amamoo MA, et al. Racial differences in mortality among Medicare recipients after treatment for localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1702-10.
4. Powell IJ, Banerjee M, Bianco FJ, et al. The effect of race/ethnicity on prostate cancer treatment outcome is conditional: a review of Wayne State University data. *J Urol* 2004;171:1508-12.
5. American-Cancer-Society. American Cancer society: Cancer Facts and Figures for African Americans 2005-2006. American Cancer Society, Atlanta 2005-2009.
6. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002;90:162-73.
7. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361:859-64.
8. Oliver SE, Gunnell D, Donovan JL. Comparison of trends in prostate-cancer mortality in England and Wales and the USA. *Lancet* 2000;355:1788-9.
9. Oliver SE, May MT, Gunnell D. International trends in prostate-cancer mortality in the "PSA ERA". *Int J Cancer* 2001;92:893-8.
10. Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* 1991;30:133-40.
11. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991;63:963-6.
12. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8-31, 1.
13. Hsing AW, Sakoda LC, Chua S, Jr. Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer. *Am J Clin Nutr* 2007;86:s843-57.
14. Hsing AW, Devesa SS, Jin F, Gao YT. Rising incidence of prostate cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:83-4.
15. Park SK, Sakoda LC, Kang D, et al. Rising prostate cancer rates in South Korea. *Prostate* 2006;66:1285-91.
16. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
17. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1017-24.
18. Mettlin C, Murphy GP, Lee F, et al. Characteristics of prostate cancers detected in a multimodality early detection program. The Investigators of the American Cancer Society-National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer* 1993;72:1701-8.
19. Derweesh IH, Kupelian PA, Zippe C, et al. Continuing trends in pathological stage migration in radical prostatectomy specimens. *Urol Oncol* 2004;22:300-6.

20. Jhaveri FM, Klein EA, Kupelian PA, Zippe C, Levin HS. Declining rates of extracapsular extension after radical prostatectomy: evidence for continued stage migration. *J Clin Oncol* 1999;17:3167-72.
21. Kupelian P, Thames H, Levy L, et al. Year of treatment as independent predictor of relapse-free survival in patients with localized prostate cancer treated with definitive radiotherapy in the PSA era. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:795-9.
22. Horninger W, Berger A, Pelzer A, et al. Screening for prostate cancer: updated experience from the Tyrol study. *Can J Urol* 2005;12 Suppl 1:7-13; discussion 92-3.
23. Etzioni R, Legler JM, Feuer EJ, Merrill RM, Cronin KA, Hankey BF. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part III: Quantifying the link between population prostate-specific antigen testing and recent declines in prostate cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1033-9.
24. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-8.
25. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-9.
26. Prorok PC, Andriole GL, Bresalier RS, et al. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials* 2000;21:273S-309S.
27. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999;281:1591-7.
28. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:878-87.
29. Holmberg L, Bill-Axelson A, Helgesen F, et al. A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 2002;347:781-9.
30. Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 2005;352:1977-84.
31. Ross LE, Berkowitz Z, Ekwueme DU. Use of the prostate-specific antigen test among U.S. men: findings from the 2005 National Health Interview Survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:636-44.
32. Cooperberg MR, Carroll PR. Prostate-cancer screening. *N Engl J Med* 2009;361:203; author reply 4-5.
33. Federman DG, Goyal S, Kamina A, Peduzzi P, Concato J. Informed consent for PSA screening: does it happen? *Eff Clin Pract* 1999;2:152-7.
34. Preston SH. Prostate-cancer screening. *N Engl J Med* 2009;361:202-3; author reply 4-6.
35. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239-46.
36. Carroll P, Albertsen PC, Greene K, et al. Prostate-Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update. American Urological Association, Education and Research, Inc 2009.
37. Catalona WJ, Preston SH, Cooperberg MR, et al. Prostate-Cancer Screening. *N Engl J Med* 2009;361:202-6.
38. Cussenot O, Cancel-Tassin G. [Genetic susceptibility to prostate cancer]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:562-8.
39. Eeles RA, Dearnaley DP, Ardern-Jones A, et al. Familial prostate cancer: the evidence and the Cancer Research Campaign/British Prostate Group (CRC/BPG) UK Familial Prostate Cancer Study. *Br J Urol* 1997;79 Suppl 1:8-14.
40. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 1990;46:222-8.

41. Risch N. The Genetic Epidemiology of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:733-41.
42. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993;150:797-802.
43. Smith JR, Freije D, Carpten JD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996;274:1371-4.
44. Cooney KA, McCarthy JD, Lange E, et al. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:955-9.
45. Eeles RA, Durocher F, Edwards S, et al. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group U.K. Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Am J Hum Genet* 1998;62:653-8.
46. Gronberg H, Xu J, Smith JR, et al. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Res* 1997;57:4707-9.
47. Gronberg H, Isaacs SD, Smith JR, et al. Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 (HPC1) locus. *JAMA* 1997;278:1251-5.
48. Goode EL, Stanford JL, Peters MA, et al. Clinical Characteristics of Prostate Cancer in an Analysis of Linkage to Four Putative Susceptibility Loci. *Clin Cancer Res* 2001;7:2739-49.
49. Carpten J, Nupponen NN, Isaacs S, et al. Germline mutations in the Ribonuclease L (RNASEL) gene in hereditary prostate cancer 1 (HPC1) linked families. *Nature Genetics* 2002;30:181-4.
50. Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 2003;42:1805-12.
51. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002;32:581-3.
52. Honda GD, Bernstein L, Ross RK, Greenland S, Gerkins V, Henderson BE. Vasectomy, cigarette smoking, and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle-aged men. *Br J Cancer* 1988;57:326-31.
53. Ewings P, Bowie C. A case-control study of cancer of the prostate in Somerset and east Devon. *Br J Cancer* 1996;74:661-6.
54. Giles GG, Severi G, English DR, et al. Sexual factors and prostate cancer. *BJU Int* 2003;92:211-6.
55. Fernandez L, Galan Y, Jimenez R, et al. Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba. *Int J Epidemiol* 2005;34:193-7.
56. Leitzmann MF, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E. Ejaculation frequency and subsequent risk of prostate cancer. *JAMA* 2004;291:1578-86.
57. Giovannucci E, Tosteson TD, Speizer FE, Ascherio A, Vessey MP, Colditz GA. A retrospective cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. *JAMA* 1993;269:878-82.
58. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective cohort study of vasectomy and prostate cancer in US men. *JAMA* 1993;269:873-7.
59. Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 2002;13:72-9.
60. Bernal-Delgado E, Latour-Perez J, Pradas-Arnal F, Gomez-Lopez LI. The association between vasectomy and prostate cancer: a systematic review of the literature. *Fertil Steril* 1998;70:191-200.
61. Holt SK, Salinas CA, Stanford JL. Vasectomy and the risk of prostate cancer. *J Urol* 2008;180:2565-7; discussion 7-8.

62. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004;101:2371-490.
63. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* 1995;122:327-34.
64. Madigan MP, Troisi R, Potischman N, Dorgan JF, Brinton LA, Hoover RN. Serum hormone levels in relation to reproductive and lifestyle factors in postmenopausal women (United States). *Cancer Causes Control* 1998;9:199-207.
65. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.
66. Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434-9.
67. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
68. Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* 2002;106:2530-2.
69. Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, et al. Body size and prostate cancer: a 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:385-9.
70. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:557-63.
71. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, et al. Body mass index and risk of prostate cancer in U.S. health professionals. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1240-4.
72. Porter MP, Stanford JL. Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate* 2005;62:316-21.
73. Svartberg J, von Muhlen D, Sundsfjord J, Jorde R. Waist circumference and testosterone levels in community dwelling men. The Tromso study. *Eur J Epidemiol* 2004;19:657-63.
74. Baillargeon J, Pollock BH, Kristal AR, et al. The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. *Cancer* 2005;103:1092-5.
75. Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, et al. Impact of obesity on biochemical control after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: a report by the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital database study group. *J Clin Oncol* 2004;22:446-53.
76. Breslow RA, Weed DL. Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971-1996. *Nutr Cancer* 1998;30:1-13.
77. Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., Lee IM. Alcohol consumption and risk of prostate cancer: The Harvard Alumni Health Study. *Int J Epidemiol* 2001;30:749-55.
78. Schoonen WM, Salinas CA, Kiemeny LA, Stanford JL. Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Int J Cancer* 2005;113:133-40.
79. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
80. Platz EA, De Marzo AM. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *J Urol* 2004;171:S36-40.
81. Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 2002;60:78-83.
82. Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate* 2002;53:263-76.
83. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 2003;170:998-1002.

84. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1985-92.
85. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:366-81.
86. Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *JAMA* 1997;278:313-21.
87. Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol* 2005;23:8152-60.
88. Taylor ML, Mainous AG, 3rd, Wells BJ. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *Fam Med* 2005;37:506-12.
89. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, et al. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* 2006;2:e25.
90. Klein EA, Silverman R. Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2008;18:315-9.
91. Kirby RS, Lowe D, Bultitude MI, Shuttleworth KE. Intra-prostatic urinary reflux: an aetiological factor in abacterial prostatitis. *Br J Urol* 1982;54:729-31.
92. Persson BE, Sjoman M, Niklasson F, Ronquist G. Uridine, xanthine and urate concentrations in prostatic fluid and seminal plasma of patients with prostatitis. *Eur Urol* 1991;19:253-6.
93. Xu J, Zheng SL, Komiya A, et al. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002;32:321-5.
94. Miller DC, Zheng SL, Dunn RL, et al. Germ-line mutations of the macrophage scavenger receptor 1 gene: association with prostate cancer risk in African-American men. *Cancer Res* 2003;63:3486-9.
95. Seppala EH, Ikonen T, Autio V, et al. Germ-line alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2003;9:5252-6.
96. Xu J, Zheng SL, Komiya A, et al. Common sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003;72:208-12.
97. Lindmark F, Jonsson BA, Bergh A, et al. Analysis of the macrophage scavenger receptor 1 gene in Swedish hereditary and sporadic prostate cancer. *Prostate* 2004;59:132-40.
98. Rennert H, Zeigler-Johnson CM, Addya K, et al. Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:949-57.
99. Sun J, Wiklund F, Hsu FC, et al. Interactions of sequence variants in interleukin-1 receptor-associated kinase4 and the toll-like receptor 6-1-10 gene cluster increase prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:480-5.
100. Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the Cancer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* 2004;64:2918-22.
101. Ellwood PM. Shattuck lecture--outcomes management. A technology of patient experience. *N Engl J Med* 1988;318:1549-56.
102. Sun J, Wiklund F, Zheng SL, et al. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:525-32.
103. Xu J, Lowey J, Wiklund F, et al. The interaction of four genes in the inflammation pathway significantly predicts prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2563-8.
104. Rennert H, Bercovich D, Hubert A, et al. A Novel Founder Mutation in the RNASEL Gene, 471delAAAG, Is Associated with Prostate Cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2002;71:981-4.

105. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, et al. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71:116-23.
106. Nakazato H, Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Yamanaka H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. *Br J Cancer* 2003;89:691-6.
107. Noonan-Wheeler FC, Wu W, Roehl KA, et al. Association of hereditary prostate cancer gene polymorphic variants with sporadic aggressive prostate carcinoma. *Prostate* 2006;66:49-56.
108. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:3369-72.
109. Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, et al. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000;163:1584-7.
110. Wu HC, Chang CH, Chen HY, Tsai FJ, Tsai JJ, Chen WC. p53 gene codon 72 polymorphism but not tumor necrosis factor-alpha gene is associated with prostate cancer. *Urol Int* 2004;73:41-6.
111. Soriano JB, Vestbo J, Pride NB, Kiri V, Maden C, Maier WC. Survival in COPD patients after regular use of fluticasone propionate and salmeterol in general practice. *Eur Respir J* 2002;20:819-25.
112. Panguluri RC, Long LO, Chen W, et al. COX-2 gene promoter haplotypes and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2004;25:961-6.
113. Shahedi K, Lindstrom S, Zheng SL, et al. Genetic variation in the COX-2 gene and the association with prostate cancer risk. *Int J Cancer* 2006;119:668-72.
114. Cheng I, Liu X, Plummer SJ, Krumroy LM, Casey G, Witte JS. COX2 genetic variation, NSAIDs, and advanced prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2007;97:557-61.
115. Veltri RW, Miller MC, Zhao G, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* 1999;53:139-47.
116. Olivetto IA, Lesperance ML, Truong PT, et al. Intervals longer than 20 weeks from breast-conserving surgery to radiation therapy are associated with inferior outcome for women with early-stage breast cancer who are not receiving chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:16-23.
117. McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DS, McArdle C. The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clin Nutr* 2002;21:161-4.
118. Fradet V, Lessard L, Begin LR, Karakiewicz P, Masson AM, Saad F. Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:8460-4.
119. Swinnen JV, Heemers H, van de Sande T, et al. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:273-9.
120. Dalbagni G, Herr HW. Current use and questions concerning intravesical bladder cancer group for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000;27:137-46.
121. Herr HW. High-risk superficial bladder cancer: transurethral resection alone in selected patients with T1 tumor. *Semin Urol Oncol* 1997;15:142-6.
122. Karin M. The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 2008;18:334-42.
123. Mahmud S, Franco E, Aprikian A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2004;90:93-9.
124. Platz EA, Rohrmann S, Pearson JD, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of prostate cancer in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:390-6.

125. Liu X, Plummer SJ, Nock NL, Casey G, Witte JS. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and decreased risk of advanced prostate cancer: modification by lymphotoxin alpha. *Am J Epidemiol* 2006;164:984-9.
126. Ross R, Bernstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson B. Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:45-8.
127. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, et al. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992;339:887-9.
128. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res* 1998;58:4497-504.
129. Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 2001;23:42-58.
130. Chen C, Weiss NS, Stanczyk FZ, et al. Endogenous sex hormones and prostate cancer risk: a case-control study nested within the Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1410-6.
131. Parsons JK, Landis P, et al. Higher serum free testosterone is associated with an increased risk of prostate cancer: results from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;116-8.
132. Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, et al. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1262-9.
133. Eaton NE, Reeves GK, Appleby PN, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 1999;80:930-4.
134. Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 2001;58:17-24; discussion
135. Andriole G, Bruchovsky N, Chung LW, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004;172:1399-403.
136. Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, et al. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1022-6.
137. Wilson MJ, Casey C, Woodson M, Sinha AA. Reverse zymography studies of protease inhibitors in the secretions of different lobes of rat prostate. *Arch Androl* 1999;42:109-18.
138. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, et al. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:735-41.
139. Balic I, Graham ST, Troyer DA, et al. Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in Hispanic men. *J Urol* 2002;168:2245-8.
140. Taplin ME, Rajeshkumar B, Halabi S, et al. Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol* 2003;21:2673-8.
141. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3777-82.
142. Makridakis NM, Reichardt JK. Molecular epidemiology of androgen-metabolic loci in prostate cancer: predisposition and progression. *J Urol* 2004;171:S25-8; discussion S8-9.
143. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, et al. Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 1999;354:975-8.
144. Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, et al. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res* 2000;60:1626-30.

145. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, et al. Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors. *Eur Urol* 2007;52:1082-7.
146. Nam RK, Zhang WW, Trachtenberg J, et al. Comprehensive assessment of candidate genes and serological markers for the detection of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1429-37.
147. Cicek MS, Conti DV, Curran A, et al. Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. *Prostate* 2004;59:69-76.
148. Loukola A, Chadha M, Penn SG, et al. Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CYP17A1, CYP3A4, and SRD5A2. *Eur J Hum Genet* 2004;12:321-32.
149. Devgan SA, Henderson BE, Yu MC, et al. Genetic variation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. *Prostate* 1997;33:9-12.
150. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, et al. Joint effect of HSD3B1 and HSD3B2 genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002;62:1784-9.
151. Ando Y, Tateishi T, Sekido Y, et al. Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1587-8.
152. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:901-5.
153. Rebbeck TR. More about: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:76.
154. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:215-24.
155. Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, et al. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1192-202.
156. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 2009;301:39-51.
157. Gaziano JM, Glynn RJ, Christen WG, et al. Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:52-62.
158. Belo L, Santos-Silva A, Caslake M, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. Oxidized-LDL levels in normal and pre-eclamptic pregnancies: contribution of LDL particle size. *Atherosclerosis* 2005;183:185-6.
159. Caron P, Audet-Walsh E, Lepine J, Belanger A, Guillemette C. Profiling endogenous serum estrogen and estrogen-glucuronides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2009;81:10143-8.
160. Counil E, Julien P, Lamarche B, Chateau-Degat ML, Ferland A, Dewailly E. Association between trans-fatty acids in erythrocytes and pro-atherogenic lipid profiles among Canadian Inuit of Nunavik: possible influences of sex and age. *Br J Nutr* 2009;102:766-76.
161. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, et al. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994;368:237-9.
162. Froehner M, Rosenberg MT. Does prostate cancer aggressiveness change with increasing age? *Int J Clin Pract* 2011;65:521-3.
163. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. *Subcell Biochem* 2007;42:193-212.

164. Imamov O, Lopatkin NA, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2773-4.
165. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1315-30.
166. Avritscher EB, Cooksley CD, Grossman HB, et al. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology* 2006;68:549-53.
167. Rehn L. Ueber blasentumoren bei fuchsinarbeitern. *Arch Kind Chir* 1895;50.
168. Morrison AS, Cole P. Epidemiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1976;3:13-29.
169. Steineck G, Plato N, Norell SE, Hogstedt C. Urothelial cancer and some industry-related chemicals: an evaluation of the epidemiologic literature. *Am J Ind Med* 1990;17:371-91.
170. Stadler W, Vogelzang NJ. Human renal cancer carcinogenesis: a review of recent advances. *Ann Oncol* 1993;4:451-62.
171. Cole P, Hoover R, Friedell GH. Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer* 1972;29:1250-60.
172. Case RA, Hosker ME, Mc DD, Pearson JT. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br J Ind Med* 1954;11:75-104.
173. Chapman JW CJ, Rosenbaum L. *Carcinoma of the Bladder*. New York: Raven Press; 1981.
174. Nortier JIL, Martinez M-CM, Schmeiser HH, et al. Urothelial Carcinoma Associated with the Use of a Chinese Herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000;342:1686-92.
175. Pfau W, Pool-Zobel BL, von der Lieth CW, Wiessler M. The structural basis for the mutagenicity of aristolochic acid. *Cancer Letters* 1990;55:7-11.
176. Turesky RJ. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* 2002;34:625-50.
177. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN, Hartge P. Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1472-80.
178. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN. Occupational risks of bladder cancer in the United States: II Nonwhite men. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1480-3.
179. Morrison AS. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* 1984;11:557-66.
180. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, et al. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer* 1989;44:622-8.
181. Augustine A, Hebert JR, Kabat GC, Wynder EL. Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res* 1988;48:4405-8.
182. Howe GR, Burch JD, Miller AB, et al. Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:701-13.
183. Paz A CS, Lobek L. Passive smoking-a risk factor for transitional carcinoma of the bladder in patients with hematuria. *J Urol* 2002;167.
184. Herr HW, Badalament RA, Amato DA, Laudone VP, Fair WR, Whitmore WF, Jr. Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol* 1989;141:22-9.
185. Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1992;19:421-8.
186. Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med* 1985;313:292-5.

187. Wahlqvist L. Bladder Tumors and Other Topics in Urological Oncology. New York: Plenum; 1980.
188. McCredie M, Stewart JH, Ford JM. Analgesics and tobacco as risk factors for cancer of the ureter and renal pelvis. *J Urol* 1983;130:28-30.
189. DeBroe ME EM. Analgesic nephropathy. *N Engl J Med* 1998;338.
190. Elcock M, Morgan RW. Update on artificial sweeteners and bladder cancer. *Regul Toxicol Pharmacol* 1993;17:35-43.
191. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 1984;119:510-5.
192. Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol* 1985;133:1034-5.
193. Pannek J. Transitional cell carcinoma in patients with spinal cord injury: a high risk malignancy? *Urology* 2002;59:240-4.
194. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 1995;45:387-96; discussion 96-7.
195. Bahnson RR. Squamous cell carcinoma of bladder. *J Urol* 1997;157:2115.
196. Hamid R, Bycroft J, Arya M, Shah PJ. Screening cystoscopy and biopsy in patients with neuropathic bladder and chronic suprapubic indwelling catheters: is it valid? *J Urol* 2003;170:425-7.
197. Herr HW, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. *J Urol* 2003;169:1706-8.
198. Tricker AR, Mostafa MH, Spiegelhalter B, Preussmann R. Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Schistosomiasis and bilharzia bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1989;10:547-52.
199. Higgy NA VA, Erturk E, Bryan GT. Augmentation of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BHBN) bladder carcinogenicity in Fischer 344 female rats by urinary infection. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1985;26.
200. LaRue H, Simoneau M, Fradet Y. Human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 1995;1:435-40.
201. Griffiths TR, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer. *BJU Int* 2000;85:211-7.
202. Duncan RE, Bennett DW, Evans AT, Aron BS, Schellhas HF. Radiation-induced bladder tumors. *J Urol* 1977;118:43-5.
203. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 1995;63:1-6.
204. Quilty PM, Kerr GR. Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clin Radiol* 1987;38:583-5.
205. Isaka S, Okano T, Abe K, Shimazaki J. Sequential instillation therapy with mitomycin C and adriamycin for superficial bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;30 Suppl:S41-4.
206. Brenner DJ, Curtis RE, Hall EJ, Ron E. Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery. *Cancer* 2000;88:398-406.
207. Bostrom PJ, Soloway MS. Secondary cancer after radiotherapy for prostate cancer: should we be more aware of the risk? *Eur Urol* 2007;52:973-82.
208. Moon K, Stukenborg GJ, Keim J, Theodorescu D. Cancer incidence after localized therapy for prostate cancer. *Cancer* 2006;107:991-8.
209. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol* 2008;179:S7-S11.

210. Vlaovic P, Jewett MA. Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *Can J Urol* 1999;6:745-8.
211. Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 1992;52:3577-81.
212. Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Hansen VL, et al. Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1988;318:1028-32.
213. Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, Ercole CJ. Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol* 1996;156:1931-3.
214. Habs MR, Schmahl D. Prevention of urinary bladder tumors in cyclophosphamide-treated rats by additional medication with the uroprotectors sodium 2-mercaptoethane sulfonate (mesna) and disodium 2,2'-dithio-bis-ethane sulfonate (dimesna). *Cancer* 1983;51:606-9.
215. Liou SH, Lung JC, Chen YH, et al. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res* 1999;59:1481-4.
216. Moore LE SA, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA, Smith MT. Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;12:1051-6.
217. Buzzee BD, Heisey DM, Messing EM. Bladder cancer in renal transplant recipients. *Urology* 1997;50:525-8.
218. Penn I. Secondary neoplasms as a consequence of transplantation and cancer therapy. *Cancer Detect Prevent* 1998;12.
219. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, et al. Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N Engl J Med* 1999;340:1390-7.
220. Kurth K, Tunn U, Ay R, et al. Adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: long-term results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trial comparing doxorubicin, ethoglucid and transurethral resection alone. *J Urol* 1997;158:378-84.
221. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1988;48:3853-5.
222. Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, et al. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 2008;40:1307-12.
223. Wu X, Ye Y, Kiemeny LA, et al. Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 2009;41:991-5.
224. Kiemeny LA SP, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Gudmundsson J, Zanon C, Kostic J, Masson G, Bjarnason H, Palsson ST, Skarphedinsson OB, Gudjonsson SA, Witjes JA, Grotenhuis AJ, Verhaegh GW, Bishop DT, Sak SC, Choudhury A, Elliott F, Barrett JH, Hurst CD, de Verdier PJ, Ryk C, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Vineis P, Polidoro S, Guarrera S, Sacerdote C, Campagna M, Placidi D, Arici C, Zeegers MP, Kellen E, Gutierrez BS, Sanz-Velez JI, Sanchez-Zalabardo M, Valdivia G, Garcia-Prats MD, Hengstler JG, Blaszkewicz M, Dietrich H, Ophoff RA, van den Berg LH, Alexiusdottir K, Kristjansson K, Geirsson G, Nikulasson S, Petursdottir V, Kong A, Thorgeirsson T, Mungan NA, Lindblom A, van Es MA, Porru S, Buntinx F, Golka K, Mayordomo JI, Kumar R, Matullo G, Steineck G, Kiltie AE, Aben KK, Jonsson E, Thorsteinsdottir U, Knowles MA, Rafnar T, Stefansson K. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 2010;45:415-9.
225. Wu X, Hildebrandt M, Chang D. Genome-wide association studies of bladder cancer risk: a field synopsis of progress and potential applications. *Cancer and Metastasis Reviews* 2009;28:269-80.

226. Lazarevic B, Garret R. Inverted papilloma and papillary transitional cell carcinoma of urinary bladder: report of four cases of inverted papilloma, one showing papillary malignant transformation and review of the literature. *Cancer* 1978;42:1904-11.
227. Huang WL, Ro JY, Grignon DJ, Swanson D, Ordonez NG, Ayala AG. Postoperative spindle cell nodule of the prostate and bladder. *J Urol* 1990;143:824-6.
228. Vekemans K, Vanneste A, Van Oyen P, Michielssen P, Denys H, Vergison R. Postoperative spindle cell nodule of bladder. *Urology* 1990;35:342-4.
229. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-48.
230. Martinez-Pineiro JA, Solsona E, Flores N, Isorna S. Improving the safety of BCG immunotherapy by dose reduction. Cooperative Group CUETO. *Eur Urol* 1995;27 Suppl 1:13-8.
231. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976;116:180-3.
232. Portillo J, Martin B, Hernandez R, et al. Results at 43 months' follow-up of a double-blind, randomized, prospective clinical trial using intravesical interferon alpha-2b in the prophylaxis of stage pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1997;49:187-90.
233. Gerber M. Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers. *Ann Nutr Metab* 2009;55:140-61.
234. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev* 2010;68:280-9.
235. Zaghloul MS. Distant metastasis from bilharzial bladder cancer. *Cancer* 1996;77:743-9.
236. Cote RJ, Chatterjee SJ. Molecular determinants of outcome in bladder cancer. *Cancer J Sci Am* 1999;5:2-15.
237. Costello AJ, Tiptaft RC, England HR, Blandy JP. Squamous cell carcinoma of bladder. *Urology* 1984;23:234-6.
238. Koss L. Atlas of Tumor Pathology, second series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1975.
239. Lynch CF, Cohen MB. Urinary system. *Cancer* 1995;75:316-29.
240. Labrie F, Candas B, Cusan L, et al. Screening decreases prostate cancer mortality: 11-year follow-up of the 1988 Quebec prospective randomized controlled trial. *Prostate* 2004;59:311-8.
241. Manunta A, Vincendeau S, Kiriakou G, Lobel B, Guille F. Non-transitional cell bladder carcinomas. *BJU Int* 2005;95:497-502.
242. Sheldon CA, Clayman RV, Gonzalez R, Williams RD, Fraley EE. Malignant urachal lesions. *J Urol* 1984;131:1-8.
243. Swanson PE, Brooks R, Pearse H, Stenzel P. Small cell carcinoma of urinary bladder. *Urology* 1988;32:558-63.
244. Prout GR, Jr., Barton BA, Griffin PP, Friedell GH. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol* 1992;148:1413-9.
245. Lutzeyer W, Rubben H, Dahm H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J Urol* 1982;127:250-2.
246. Thompson RA, Jr., Campbell EW, Jr., Kramer HC, Jacobs SC, Naslund MJ. Late invasive recurrence despite long-term surveillance for superficial bladder cancer. *J Urol* 1993;149:1010-1.
247. Cheng L NR, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: Clinical and biologic implications. *Cancer* 1999;86:2102.
248. Thorstenson A LH, Wijkstrom H, et al. Bladder cancer characteristics in a population based study of newly detected tumors. *J Urol* 2003;169.

249. Cookson MS, Sarosdy MF. Management of stage T1 superficial bladder cancer with intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol* 1992;148:797-801.
250. Norming U, Tribukait B, Nyman CR, Nilsson B, Wang N. Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 grade 3 carcinoma of the bladder. *J Urol* 1992;148:1420-6; discussion 6-7.
251. Freeman JA, Esrig D, Stein JP, et al. Radical cystectomy for high risk patients with superficial bladder cancer in the era of orthotopic urinary reconstruction. *Cancer* 1995;76:833-9.
252. Herr HW, Donat SM, Dalbagni G. Correlation of cystoscopy with histology of recurrent papillary tumors of the bladder. *J Urol* 2002;168:978-80.
253. Borhan A, Reeder JE, O'Connell MJ, et al. Grade progression and regression in recurrent urothelial cancer. *J Urol* 2003;169:2106-9.
254. Messing EM, Vaillancourt A. Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med* 1990;32:838-45.
255. Sheinfeld J, Reuter VE, Melamed MR, et al. Enhanced bladder cancer detection with the Lewis X antigen as a marker of neoplastic transformation. *J Urol* 1990;143:285-8.
256. Hayes RB, Friedell GH, Zahm SH, Cole P. Are the known bladder cancer risk-factors associated with more advanced bladder cancer? *Cancer Causes Control* 1993;4:157-62.
257. Vaidya A, Soloway MS, Hawke C, Tiguert R, Civantos F. De novo muscle invasive bladder cancer: is there a change in trend? *J Urol* 2001;165:47-50; discussion
258. Messing E. Editorial comment: De novo muscle invasive bladder cancer: Is there a change in trend? *J Urol* 2001;165.
259. Kaye KW LP. Mode of presentation of invasive bladder cancer: Reassessment of the problem. *J Urol* 1982;128.
260. Hopkins SC, Ford KS, Soloway MS. Invasive bladder cancer: support for screening. *J Urol* 1983;130:61-4.
261. Madgar I GB, Czerniak A, Many M. Leiomyosarcoma of the ureter. *Eur Urol* 1988;14:487-9.
262. Wolf H HK. Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumors as a determinant factor for future new recurrences. *Lancet* 1983;2.
263. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, et al. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083-6.
264. Holmäng S HH, Anderström C, Holmberg E, Johansson SL. The importance of the depth of invasion in stage T1 bladder carcinoma: a prospective cohort study. *J Urol* 1997;157:800-3.
265. Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000;163:73-8.
266. Waples MJ ME. The management of stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder. . St. Louis, Mosby-Year Book.: Lytton B (ed); 1992.
267. Grossman HB DP. Markers of bladder cancer: State of the art. . *Urol Oncol* 2000;5.
268. Ismail HA, Pollak M, Behloul H, Tanguay S, Begin LR, Aprikian AG. Serum insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-3 do not correlate with Gleason score or quantity of prostate cancer in biopsy samples. *BJU Int* 2003;92:699-702.
269. Jimenez-Cruz JF, Vera-Donoso CD, Leiva O, et al. Intravesical immunoprophylaxis in recurrent superficial bladder cancer (Stage T1): multicenter trial comparing bacille Calmette-Guerin and interferon-alpha. *Urology* 1997;50:529-35.
270. Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002;168:1964-70.

271. Bohle A. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *Int Braz J Urol* 2004;30:353-4.
272. Morales A, Nickel JC. Immunotherapy for superficial bladder cancer. A developmental and clinical overview. *Urol Clin North Am* 1992;19:549-56.
273. Melekos MD, Chionis H, Pantazakos A, Fokaefs E, Paranychianakis G, Dauaher H. Intravesical bacillus Calmette-Guerin immunoprophylaxis of superficial bladder cancer: results of a controlled prospective trial with modified treatment schedule. *J Urol* 1993;149:744-8.
274. Pagano F, Bassi P, Piazza N, Abatangelo G, Drago Ferrante GL, Milani C. Improving the efficacy of BCG immunotherapy by dose reduction. *Eur Urol* 1995;27 Suppl 1:19-22.
275. Belldegrin AS, Franklin JR, O'Donnell MA, et al. Superficial bladder cancer: the role of interferon-alpha. *J Urol* 1998;159:1793-801.
276. Duchek M, Johansson R, Jahnson S, et al. Bacillus Calmette-Guerin is superior to a combination of epirubicin and interferon-alpha2b in the intravesical treatment of patients with stage T1 urinary bladder cancer. A prospective, randomized, Nordic study. *Eur Urol* 2010;57:25-31.
277. Nepple KG, Lightfoot AJ, Rosevear HM, O'Donnell MA, Lamm DL. Bacillus Calmette-Guerin With or Without Interferon alpha-2b and Megadose Versus Recommended Daily Allowance Vitamins During Induction and Maintenance Intravesical Treatment of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *J Urol* 2010.
278. Zincke H, Utz DC, Taylor WF, Myers RP, Leary FJ. Influence of thiotepa and doxorubicin instillation at time of transurethral surgical treatment of bladder cancer on tumor recurrence: a prospective, randomized, double-blind, controlled trial. *J Urol* 1983;129:505-9.
279. Klan R, Loy V, Huland H. Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1991;146:316-8.
280. Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Casanova J, Dumont R. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term followup. *J Urol* 1999;161:1120-3.
281. Duque JL, Loughlin KR. An overview of the treatment of superficial bladder cancer. Intravesical chemotherapy. *Urol Clin North Am* 2000;27:125-35, x.
282. Bouffieux C, Kurth KH, Bono A, et al. Intravesical adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: results of 2 European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trials with mitomycin C and doxorubicin comparing early versus delayed instillations and short-term versus long-term treatment. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group. *J Urol* 1995;153:934-41.
283. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, et al. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J Urol* 1996;155:1233-8.
284. Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991;325:1205-9.
285. Bohle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004;63:682-6; discussion 6-7.
286. Au JL, Badalament RA, Wientjes MG, et al. Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:597-604.
287. Thrasher JB, Crawford ED. Complications of intravesical chemotherapy. *Urol Clin North Am* 1992;19:529-39.

288. Herr HW, Sogani PC. Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? *J Urol* 2001;166:1296-9.
289. Stein JP. Contemporary concepts of radical cystectomy and the treatment of bladder cancer. *J Urol* 2003;169:116-7.
290. Hautmann RE, Volkmer BG, Gust K. Quantification of the survival benefit of early versus deferred cystectomy in high-risk non-muscle invasive bladder cancer (T1 G3). *World J Urol* 2009;27:347-51.
291. Silberstein JL, Parsons JK. Evidence-based principles of bladder cancer and diet. *Urology* 2010;75:340-6.
292. Brinkman M, Zeegers MP. Nutrition, total fluid and bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008;25-36.
293. Koebnick C, Michaud D, Moore SC, et al. Body mass index, physical activity, and bladder cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1214-21.
294. Reese AC, Fradet V, Witte JS. Omega-3 fatty acids, genetic variants in COX-2 and prostate cancer. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009;2:149-58.
295. Society AC. Cancer Facts and Figures. Atlanta: American Cancer Society; 2009.
296. Johansson JE, Holmberg L, Johansson S, Bergstrom R, Adami HO. Fifteen-year survival in prostate cancer. A prospective, population-based study in Sweden. *JAMA* 1997;277:467-71.
297. Jani AB, Vaida F, Hanks G, et al. Changing face and different countenances of prostate cancer: racial and geographic differences in prostate-specific antigen (PSA), stage, and grade trends in the PSA era. *Int J Cancer* 2001;96:363-71.
298. Wilt TJ, MacDonald R, Rutks I, Shamliyan TA, Taylor BC, Kane RL. Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer. *Ann Intern Med* 2008;148:435-48.
299. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:256-69.
300. Rose DP. Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:224-33.
301. Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 2003;77:532-43.
302. McEntee MF, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. *Biomed Pharmacother* 2002;56:380-7.
303. Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc* 2009;109:668-79.
304. Calviello G, Serini S, Piccioni E, Pessina G. Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr Cancer* 2009;61:287-301.
305. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009;77:937-46.
306. Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ* 2006;332:752-60.
307. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000;42:73-8.
308. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol* 2000;164:820-5.

309. Nelson JE, Harris RE. Inverse association of prostate cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): results of a case-control study. *Oncol Rep* 2000;7:169-70.
310. Norrish AE, Jackson RT, McRae CU. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer progression. *Int J Cancer* 1998;77:511-5.
311. Roberts RO, Jacobson DJ, Girman CJ, Rhodes T, Lieber MM, Jacobsen SJ. A population-based study of daily nonsteroidal anti-inflammatory drug use and prostate cancer. *Mayo Clin Proc* 2002;77:219-25.
312. Aronson WJ, Glaspy JA, Reddy ST, Reese D, Heber D, Bagga D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology* 2001;58:283-8.
313. Kelavkar UP, Hutzley J, Dhir R, Kim P, Allen KG, McHugh K. Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6:omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. *Neoplasia* 2006;8:112-24.
314. Kelavkar UP, Hutzley J, McHugh K, Allen KG, Parwani A. Prostate tumor growth can be modulated by dietarily targeting the 15-lipoxygenase-1 and cyclooxygenase-2 enzymes. *Neoplasia* 2009;11:692-9.
315. Berquin IM, Min Y, Wu R, et al. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest* 2007;117:1866-75.
316. McEntee MF, Ziegler C, Reel D, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids enhance hormone ablation therapy in androgen-dependent prostate cancer. *Am J Pathol* 2008;173:229-41.
317. Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004;79:935-45.
318. Narayanan NK, Narayanan BA, Reddy BS. A combination of docosahexaenoic acid and celecoxib prevents prostate cancer cell growth in vitro and is associated with modulation of nuclear factor-kappaB, and steroid hormone receptors. *Int J Oncol* 2005;26:785-92.
319. Augustsson K, Michaud DS, Rimm EB, et al. A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:64-7.
320. Terry P, Lichtenstein P, Feychting M, Ahlbom A, Wolk A. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *Lancet* 2001;357:1764-6.
321. Schuurman AG, van den Brandt PA, Dorant E, Brants HA, Goldbohm RA. Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 1999;86:1019-27.
322. Laaksonen DE, Laukkanen JA, Niskanen L, et al. Serum linoleic and total polyunsaturated fatty acids in relation to prostate and other cancers: a population-based cohort study. *Int J Cancer* 2004;111:444-50.
323. Park SY, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study. *Int J Cancer* 2007;121:1339-45.
324. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Michaud DS, et al. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am J Clin Nutr* 2004;80:204-16.
325. Amin M, Jeyaganth S, Fahmy N, et al. Dietary habits and prostate cancer detection: a case-control study. *Can Urol Assoc J* 2008;2:510-5.
326. Mina K, Fritschi L, Johnson KC. An inverse association between preserved fish and prostate cancer: results from a population-based case-control study in Canada. *Nutr Cancer* 2008;60:222-6.
327. Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr* 1999;70:85-90.
328. Bidoli E, Talamini R, Bosetti C, et al. Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk. *Ann Oncol* 2005;16:152-7.

329. Hedelin M, Chang ET, Wiklund F, et al. Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *Int J Cancer* 2007;120:398-405.
330. Allen NE, Sauvaget C, Roddam AW, et al. A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men. *Cancer Causes Control* 2004;15:911-20.
331. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, et al. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1571-9.
332. Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2007;121:1571-8.
333. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, et al. Nutritional factors and prostate cancer: a case-control study of French Canadians in Montreal, Canada. *Cancer Causes Control* 1996;7:428-36.
334. Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M. Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* 1995;6:145-54.
335. Tzonou A, Signorello LB, Lagiou P, Wu J, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Diet and cancer of the prostate: a case-control study in Greece. *Int J Cancer* 1999;80:704-8.
336. Ramon JM, Bou R, Romea S, et al. Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer Causes Control* 2000;11:679-85.
337. Chavarro JE, Stampfer MJ, Hall MN, Sesso HD, Ma J. A 22-y prospective study of fish intake in relation to prostate cancer incidence and mortality. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1297-303.
338. Crowe FL, Key TJ, Appleby PN, et al. Dietary fat intake and risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1405-13.
339. Koralek DO, Peters U, Andriole G, et al. A prospective study of dietary alpha-linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2006;17:783-91.
340. Schuurman AG, van den Brandt PA, Dorant E, Goldbohm RA. Animal products, calcium and protein and prostate cancer risk in The Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 1999;80:1107-13.
341. Veierod MB, Laake P, Thelle DS. Dietary fat intake and risk of prostate cancer: a prospective study of 25,708 Norwegian men. *Int J Cancer* 1997;73:634-8.
342. Wallstrom P, Bjartell A, Gullberg B, Olsson H, Wirfalt E. A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmo, Sweden). *Cancer Causes Control* 2007;18:1107-21.
343. Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, et al. Energy, nutrient intake and prostate cancer risk: a population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 1996;68:716-22.
344. Kristal AR, Cohen JH, Qu P, Stanford JL. Associations of energy, fat, calcium, and vitamin D with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:719-25.
345. Kolonel LN. Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:72-81.
346. Pham TM, Fujino Y, Kubo T, et al. Fish intake and the risk of fatal prostate cancer: findings from a cohort study in Japan. *Public Health Nutr* 2009;12:609-13.
347. Bairati I, Meyer F, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and advanced prostate cancer. *J Urol* 1998;159:1271-5.
348. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Boffetta P, Ronco A, Mendilaharsu M. Alpha-linolenic acid and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:335-8.
349. Fradet V, Cheng I, Casey G, Witte JS. Dietary omega-3 fatty acids, cyclooxygenase-2 genetic variation, and aggressive prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2009;15:2559-66.
350. Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and prostate cancer survival. *Cancer Causes Control* 1999;10:245-51.

351. Cancer Statistics in Japan. 2007. (Accessed August, 2008, at http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/backnumber/2007_en.html.)
352. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 2006;296:1885-99.
353. Brouwer A, Longnecker MP, Birnbaum LS, et al. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ Health Perspect* 1999;107 Suppl 4:639-49.
354. Ritchie JM, Vial SL, Fuortes LJ, et al. Comparison of proposed frameworks for grouping polychlorinated biphenyl congener data applied to a case-control pilot study of prostate cancer. *Environ Res* 2005;98:104-13.
355. Massaro M, Habib A, Lubrano L, et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15184-9.
356. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.
357. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 1992;33:1569-82.
358. Grundy SM. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1988;319:24-33.
359. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
360. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
361. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-9.
362. Brown G, Albers JJ, Fisher LD, et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990;323:1289-98.
363. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615-22.
364. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
365. Topol EJ. Intensive statin therapy--a sea change in cardiovascular prevention. *N Engl J Med* 2004;350:1562-4.
366. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356:1627-31.
367. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;57:1439-43.
368. Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 2004;23:94-8.
369. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology* 2002;59:990-7.
370. Sena A, Pedrosa R, Graca Morais M. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003;250:754-5.

371. Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004;363:1607-8.
372. Kanda H, Hamasaki K, Kubo K, et al. Antiinflammatory effect of simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:2024-6.
373. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;363:2015-21.
374. Chan KA, Andrade SE, Boles M, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000;355:2185-8.
375. Rejnmark L, Olsen ML, Johnsen SP, Vestergaard P, Sorensen HT, Mosekilde L. Hip fracture risk in statin users--a population-based Danish case-control study. *Osteoporos Int* 2004;15:452-8.
376. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H. Statin drugs and the risk of fracture. *JAMA* 2000;284:1921-2.
377. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211-6.
378. Blais L, Desgagne A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study.[see comment]. *Archives of Internal Medicine* 2000;160:2363-8.
379. Bjerre LM, LeLorier J. Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials.[see comment]. *American Journal of Medicine* 2001;110:716-23.
380. Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts ACG, Richel DJ, Guchelaar H-J. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004;22:2388-94.
381. Graaf MR, Richel DJ, van Noorden CJF, Guchelaar H-J. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2004;30:609-41.
382. Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, Sitaras NM. Statins and cancer risk: a literature-based meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2006;24:4808-17.
383. Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, Kluger J, White CM. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *JAMA* 2006;295:74-80.
384. Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, et al. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *American Journal of Epidemiology* 2005;162:318-25.
385. Katz MO ZM, Marion C, et al. Statin use is associated with improved biochemical outcome after high-dose radiotherapy for clinically localized prostate cancer [abstract]. . *Proceedings of the 45th annual ASTRO meeting, Salt Lake City, Utah American Society of Clinical Oncology (publisher/organizer)* 2003;57:S271.
386. Moyad MA, Merrick GS, Butler WM, et al. Statins, especially atorvastatin, may favorably influence clinical presentation and biochemical progression-free survival after brachytherapy for clinically localized prostate cancer. *Urology* 2005;66:1150-4.
387. Tsai HK, Katz MS, Coen JJ, Zietman AL, Kaufman DS, Shipley WU. Association of statin use with improved local control in patients treated with selective bladder preservation for muscle-invasive bladder cancer. *Urology* 2006;68:1188-92.
388. Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005;5:930-42.
389. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7:687-92.
390. Veillard NR, Mach F. Statins: the new aspirin? *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1771-86.

391. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739-45.
392. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:959-68.
393. Sasaki R, Habuchi T, Sato K, et al. The Clinical Utility of Measuring Total PSA, PSA Density, \geq -Seminoprotein and \geq -Seminoprotein/Total PSA in Prostate Cancer Prediction. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2000;30:337-42.
394. Hoffmann P, Roumeguere T, Schulman C, van Velthoven R. Use of statins and outcome of BCG treatment for bladder cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2705-7.
395. Kamat AM, Wu X. Statins and the effect of BCG on bladder cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1276; author reply -7.
396. Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:26-37.
397. Rothman KJ. *Epidemiology: an introduction*. Oxford University Press Inc 2002:202-3.
398. Csizmadi I, Collet J-P. Bias and Confounding in Pharmacoepidemiology. In: Strom BL, Kimmel SE, eds. *Textbook of Pharmacoepidemiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2006:261-75.
399. Dennis LK, Dawson DV, Resnick MI. Vasectomy and the risk of prostate cancer: a meta-analysis examining vasectomy status, age at vasectomy, and time since vasectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5:193-203.
400. Platz EA, Yeole BB, Cho E, Jussawalla DJ, Giovannucci E, Ascherio A. Vasectomy and prostate cancer: a case-control study in India. *Int J Epidemiol* 1997;26:933-8.
401. Stark CR, Mantel N. Effects of maternal age and birth order on the risk of mongolism and leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1966;37:687-98.
402. Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *N Engl J Med* 2005;353:487-97.
403. Dormuth CR, Patrick AR, Shrank WH, et al. Statin adherence and risk of accidents: a cautionary tale. *Circulation* 2009;119:2051-7.
404. Petri H, Urquhart J. Channeling bias in the interpretation of drug effects. *Stat Med* 1991;10:577-81.
405. Loughheed MD, Lemiere C, Dell SD, et al. Canadian Thoracic Society Asthma Management Continuum--2010 Consensus Summary for children six years of age and over, and adults. *Can Respir J* 2010;17:15-24.
406. Krumholz HM, Anderson JL, Bachelder BL, et al. ACC/AHA 2008 performance measures for adults with ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to develop performance measures for ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction): developed in collaboration with the American Academy of Family Physicians and the American College of Emergency Physicians: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Hospital Medicine. *Circulation* 2008;118:2596-648.
407. Strom BL, Miettinen OS, Melmon KL. Postmarketing studies of drug efficacy: when must they be randomized? *Clin Pharmacol Ther* 1983;34:1-7.
408. Nishimura RA, Carabello BA, Faxon DP, et al. ACC/AHA 2008 Guideline update on valvular heart disease: focused update on infective endocarditis: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:676-85.

409. Miettinen OS, Cook EF. Confounding: essence and detection. *Am J Epidemiol* 1981;114:593-603.
410. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, and Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: AICR. 2007.
411. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
412. Le Marchand L, Kolonel LN, Wilkens LR, Myers BC, Hirohata T. Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology* 1994;5:276-82.
413. Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, Fraser GE. Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* 1989;64:598-604.
414. Pham TM, Fujino Y, Kubo T, et al. Fish intake and the risk of fatal prostate cancer: findings from a cohort study in Japan. *Public Health Nutr* 2008;1-5.
415. Astorg P. Dietary N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Causes Control* 2004;15:367-86.
416. Brouwer IA, Katan MB, Zock PL. Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *J Nutr* 2004;134:919-22.
417. Schakel SF. Maintaining a nutrient database in a changing marketplace: Keeping pace with changing food products: A research perspective. *Journal of Food Composition and Analysis* 2001;14:315-22.
418. Schakel SF, Buzzard IM, Gebhardt SE. Procedures for estimating nutrient values for food composition databases. *Journal of Food Composition and Analysis* 1997;10:102-14.
419. Schakel SF, Sievert YA, Buzzard IM. Sources of data for developing and maintaining a nutrient database. *J Am Diet Assoc* 1988;88:1268-71.
420. Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly P. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-320.
421. Brawley OW. Prostate carcinoma incidence and patient mortality: the effects of screening and early detection. *Cancer* 1997;80:1857-63.
422. Ung JO, Richie JP, Chen MH, Renshaw AA, D'Amico AV. Evolution of the presentation and pathologic and biochemical outcomes after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer diagnosed during the PSA era. *Urology* 2002;60:458-63.
423. Gee WF, Holtgrewe HL, Albertsen PC, et al. Subspecialization, recruitment and retirement trends of American urologists.[see comment]. *J Urol* 1998;159:509-11.
424. Kuoppala J, Lamminpaa A, Pukkala E. Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2008;44:2122-32.
425. Iwata H, Aoyama T, Kusumi E, Hamaki T, Kami M. Limitations of a meta-analysis investigating the association between cancer and statin use. *Am J Med* 2002;112:157-.
426. Browning DR, Martin RM. Statins and risk of cancer: a systematic review and metaanalysis. *Int J Cancer* 2007;120:833-43.
427. Bonovas S, Sitaras NM. Does pravastatin promote cancer in elderly patients? A meta-analysis. *Cmaj* 2007;176:649-54.
428. Gutt R, Tonlaar N, Kunnavakkam R, Karrison T, Weichselbaum RR, Liauw SL. Statin Use and Risk of Prostate Cancer Recurrence in Men Treated With Radiation Therapy. *J Clin Oncol* 2010;28:2653-9.
429. Hamilton RJ, Banez LL, Aronson WJ, et al. Statin medication use and the risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy: results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital (SEARCH) Database. *Cancer* 2010;116:3389-98.

430. Kwan ML, Habel LA, Flick ED, Quesenberry CP, Caan B. Post-diagnosis statin use and breast cancer recurrence in a prospective cohort study of early stage breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:573-9.
431. Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:567-85.
432. Tamblyn R, Lavoie G, Petrella L, Monette J. The use of prescription claims databases in pharmacoepidemiological research: the accuracy and comprehensiveness of the prescription claims database in Quebec. *Journal of Clinical Epidemiology* 1995;48:999-1009.
433. Tamblyn R, Reid T, Mayo N, McLeod P, Churchill-Smith M. Using medical services claims to assess injuries in the elderly: sensitivity of diagnostic and procedure codes for injury ascertainment. *Journal of Clinical Epidemiology* 2000;53:183-94.
434. Rahme E, Pilote L, LeLorier J. Association between naproxen use and protection against acute myocardial infarction.[see comment][erratum appears in *Arch Intern Med* 2002 Sep 9;162(16):1858]. *Archives of Internal Medicine* 2002;162:1111-5.
435. Sheehy O, LeLorier J, Rinfret S. Restrictive access to clopidogrel and mortality following coronary stent implantation. *Cmaj* 2008;178:413-20.
436. Zhou Z, Rahme E, Pilote L. Association between time of statin initiation after hospital discharge from acute myocardial infarction and risk of recurrence and mortality in patients ≥ 65 years of age. *Am J Cardiol* 2006;97:155-9.
437. Fahmy N, Aprikian A, Tanguay S, et al. Practice patterns and recurrence after partial cystectomy for bladder cancer. *World J Urol* 2010;28:419-23.
438. Fahmy N, Kassouf W, Jeyaganth S, et al. An analysis of preoperative delays prior to radical cystectomy for bladder cancer in Quebec. *Can Urol Assoc J* 2008;2:102-8.
439. Mahmud SM, Fong B, Fahmy N, Tanguay S, Aprikian AG. Effect of preoperative delay on survival in patients with bladder cancer undergoing cystectomy in Quebec: a population based study. *J Urol* 2006;175:78-83; discussion
440. Which statin, what dose? *Drug Ther Bull* 2007;45:33-7.
441. Weng TC, Yang YH, Lin SJ, Tai SH. A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J Clin Pharm Ther* 2010;35:139-51.
442. Zhou Z, Rahme E, Pilote L. Are statins created equal? Evidence from randomized trials of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin for cardiovascular disease prevention. *Am Heart J* 2006;151:273-81.
443. Sharma M, Ansari MT, Abou-Setta AM, et al. Systematic Review: Comparative Effectiveness and Harms of Combinations of Lipid-Modifying Agents and High-Dose Statin Monotherapy. *Ann Intern Med* 2009.
444. Farwell WR, Scranton RE, Lawler EV, et al. The association between statins and cancer incidence in a veterans population. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:134-9.
445. Scranton RE, Young M, Lawler E, Solomon D, Gagnon D, Gaziano JM. Statin use and fracture risk: study of a US veterans population. *Arch Intern Med* 2005;165:2007-12.
446. Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC. Statins and cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1897-8.
447. Hamilton RJ, Freedland SJ. Review of recent evidence in support of a role for statins in the prevention of prostate cancer. *Current Opinion In Urology* 2008;18:333-9.
448. Stimson CJ, Cookson MS, Barocas DA, et al. Preoperative Hydronephrosis Predicts Extravesical and Node Positive Disease in Patients Undergoing Cystectomy for Bladder Cancer. *J Urol* 2010.
449. Ahern TP, Pedersen L, Tarp M, et al. Statin Prescriptions and Breast Cancer Recurrence Risk: A Danish Nationwide Prospective Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 2011.

450. Harputluoglu H, Dizdar O, Karaahmet F, Altundag K. Post-diagnosis statin use and breast recurrence sites in early stage breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat* 2008;110:541.
451. Breau RH, Karnes RJ, Jacobson DJ, et al. The association between statin use and the diagnosis of prostate cancer in a population based cohort. *J Urol* 2010;184:494-9.
452. Suissa S. Immortal time bias in pharmaco-epidemiology. *Am J Epidemiol* 2008;167:492-9.
453. Sylvestre MP, Huszti E, Hanley JA. Do OSCAR winners live longer than less successful peers? A reanalysis of the evidence. *Ann Intern Med* 2006;145:361-3; discussion 92.
454. Messmer BJ, Nora JJ, Leachman RD, Cooley DA. Survival-times after cardiac allografts. *Lancet* 1969;1:954-6.
455. Clark DA, Stinson EB, Griep RB, Schroeder JS, Shumway NE, Harrison DC. Cardiac transplantation in man. VI. Prognosis of patients selected for cardiac transplantation. *Ann Intern Med* 1971;75:15-21.
456. Gail MH. Does cardiac transplantation prolong life? A reassessment. *Ann Intern Med* 1972;76:815-7.
457. Mantel N, Byar DP. Evaluation of Response-Time Data Involving Transient States: An Illustration Using Heart-Transplant Data. *Journal of the American Statistical Association* 1974;69:81-6.
458. Sin DD, Man SF, Tu JV. Inhaled glucocorticoids in COPD: immortal time bias. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:126-7.
459. Suissa S. Effectiveness of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: immortal time bias in observational studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:49-53.
460. Suissa S. Inhaled steroids and mortality in COPD: bias from unaccounted immortal time. *Eur Respir J* 2004;23:391-5.
461. Suissa S, Ernst P. Bias in observational study of the effectiveness of nasal corticosteroids in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:714-9.
462. Suissa S. Immortal time bias in observational studies of drug effects. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007;16:241-9.
463. van Walraven C, Davis D, Forster AJ, Wells GA. Time-dependent bias was common in survival analyses published in leading clinical journals. *J Clin Epidemiol* 2004;57:672-82.
464. Glesby MJ, Hoover DR. Survivor treatment selection bias in observational studies: examples from the AIDS literature. *Ann Intern Med* 1996;124:999-1005.
465. Zhou Z, Rahme E, Abrahamowicz M, Pilote L. Survival bias associated with time-to-treatment initiation in drug effectiveness evaluation: a comparison of methods. *Am J Epidemiol* 2005;162:1016-23.
466. Lash TL, Cole SR. Immortal person-time in studies of cancer outcomes. *J Clin Oncol* 2009;27:e55-6.
467. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL, eds. *Modern Epidemiology - Third Edition*. Third ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
468. Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang IJ, Ro J. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3837-45.
469. Levesque LE, Hanley JA, Kezouh A, Suissa S. Problem of immortal time bias in cohort studies: example using statins for preventing progression of diabetes. *BMJ* 2010;340:b5087.
470. Souhami L, Bae K, Pilepich M, Sandler H. Impact of the duration of adjuvant hormonal therapy in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy: a secondary analysis of RTOG 85-31. *J Clin Oncol* 2009;27:2137-43.

471. Sharma M, Ansari MT, Abou-Setta AM, et al. Systematic review: comparative effectiveness and harms of combination therapy and monotherapy for dyslipidemia. *Ann Intern Med* 2009;151:622-30.
472. Maitland-van der Zee AH, Klungel OH, Stricker BH, et al. Comparison of two methodologies to analyze exposure to statins in an observational study on effectiveness. *J Clin Epidemiol* 2004;57:237-42.
473. Robins JM, Finkelstein DM. Correcting for noncompliance and dependent censoring in an AIDS Clinical Trial with inverse probability of censoring weighted (IPCW) log-rank tests. *Biometrics* 2000;56:779-88.
474. Benson MC, Whang IS, Pantuck A, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992;147:815-6.
475. Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, et al. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1819-25.
476. Krane LS, Kaul SA, Stricker HJ, Peabody JO, Menon M, Agarwal PK. Men presenting for radical prostatectomy on preoperative statin therapy have reduced serum prostate specific antigen. *J Urol* 2010;183:118-24.
477. Hamilton RJ, Goldberg KC, Platz EA, Freedland SJ. The influence of statin medications on prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1511-8.
478. Platz EA, Clinton SK, Giovannucci E. Association between plasma cholesterol and prostate cancer in the PSA era. *International Journal Of Cancer Journal International Du Cancer* 2008;123:1693-8.
479. Nambi V, Ballantyne CM. Combination therapy with statins and omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 2006;98:34i-8i.
480. Colhoun HM. Eicosapentaenoic acid for prevention of major coronary events. *Lancet* 2007;370:215; author reply -6.
481. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 2007;369:1090-8.
482. Zeman M, Zak A, Vecka M, Tvrzicka E, Pisarikova A, Stankova B. N-3 fatty acid supplementation decreases plasma homocysteine in diabetic dyslipidemia treated with statin-fibrate combination. *J Nutr Biochem* 2006;17:379-84.
483. Maki KC, McKenney JM, Reeves MS, Lubin BC, Dicklin MR. Effects of adding prescription omega-3 acid ethyl esters to simvastatin (20 mg/day) on lipids and lipoprotein particles in men and women with mixed dyslipidemia. *Am J Cardiol* 2008;102:429-33.
484. Maki KC, Dicklin MR, Davidson MH, Doyle RT, Ballantyne CM. Baseline lipoprotein lipids and low-density lipoprotein cholesterol response to prescription omega-3 acid ethyl ester added to Simvastatin therapy. *Am J Cardiol* 2010;105:1409-12.
485. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991;54:438-63.
486. Quist-Paulsen P. Statins and inflammation: an update. *Curr Opin Cardiol* 2010;25:399-405.
487. Liao JK. Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:624-9.
488. Cochrane AL. Archie Cochrane in his own words. Selections arranged from his 1972 introduction to "Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on the Health Services" 1972. *Control Clin Trials* 1989;10:428-33.
489. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern Epidemiology*. Third ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
490. Thompson JS, Sood A, Arora R. Statins and cancer: a potential link? *Am J Ther* 2010;17:e100-4.

491. Thompson IM, Tangen CM, Klein EA, Lippman SM. Phase III prostate cancer prevention trials: are the costs justified? *J Clin Oncol* 2005;23:8161-4.